

DIE IMMUNCHEMIE DES PEPTIDOGLYCANS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereichs Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hans Peter Seidl
aus München

München 1977

DIE IMMUNCHEMIE DES PEPTIDOGLYCANS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereichs Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hans Peter Seidl
aus München

München 1977



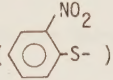
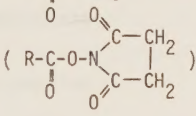
1. Berichterstatter : Prof.Dr. K.H. Schleifer
2. Berichterstatter : Prof.Dr. O. Kandler
Tag der mündlichen Prüfung : 18.10.1977

Verwendete Abkürzungen

=====

Ac-	Acetyl-	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}- \end{array}$
ϵ -Acp	ϵ -Aminocaprinsäure	
AG	Antigen	
AK	Antikörper	
Ala	Alanin	
As	Aminosäure	
Asp	Asparaginsäure	
BDB	Bis-Diazobenzidin	
ber.	berechneter Wert	
t-Boc-	tertiär Butyloxycarbonyl-	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{O} \\ \quad \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{C}- \end{array}$
BuOH	n-Butanol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
C-	Carboxyl-	
Cbo-	N-Carbobenzoxy-, Benzyloxycarbonyl-	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}- \end{array}$
DA	Diaminosäure	
DAAO	D-Aminosäureoxydase	
DC-	Dünnschicht-	
DCCI	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	
DCH	N,N'-Dicyclohexylharnstoff	
-DCHA	Dicyclohexylaminsalz	
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-	
DMF	Dimethylformamid	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
Dpm	Diaminopimelinsäure*	
DNP-	2,4-Dinitrophenyl-	$\begin{array}{c} \text{NO}_2 \\ \\ \text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3- \end{array}$
Et-	Äthyl-	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-$
EtNH_2	Äthylamin	
Et_3N	Triäthylamin	
EtOH	Äthanol	

EtOAc	Äthylacetat	
FDNB	1-Fluor-2,4-Dinitrobenzol	
fl.	flüssig	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{C}- \end{array}$
For-	Formyl-	($\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{C}- \end{array} \text{)}$
Fp.	Schmelzpunkt	
G = GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin	
GalNAc	N-Acetyl-D-Galactosamin	
gef.	gefundener Wert	
Glc	D-Glucose	
Glc- α -CH ₃	α -Methyl-D-glucosid	
Glc- β -CH ₃	β -Methyl-D-glucosid	
Glc- β -1,4-Glc	Cellobiose	
GlcNAc-GlcNAc	N-Acetyl-Chitobiose	
(GlcNAc-GlcNAc) ₂	N-Acetyl-Chitotetraose	
GlcNH ₂	D-Glucosamin	
Glu	Glutaminsäure	
Gly	Glycin	
H	Hapten	
HC	Hämocyanin	
HD-	Hefe-Dextrose-	
His	Histidin	
HOAc	Eisessig	
HSA	Humanserumalbumin	
IE	Internationale Einheit	
IgG	Immunoglobulin G, γ -Globulin	
im-	Imidazyl-	
IP	Interpeptidbrücke	
JAc-	Jodacetyl-	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{J}-\text{CH}_2-\text{C}- \end{array}$
Lit.	Literaturwert	
Lys	Lysin	
m	molar	
mM	milliMol	
M = MurNAc	N-Acetyl-D-Muraminsäure	

ManNAc	N-Acetyl-D-Mannosamin
ManNH ₂	D-Mannosamin
ManNUA	Mannosaminuronsäure
Me-	Methyl- (H ₃ C-)
MG	Molekulargewicht
MurNH ₂	D-Muraminsäure
(MurNAc)-NH-Et	N-Acetyl-D-Muraminsäureäthylamid
MXDI	meta-Xylylen-Diisocyanat
N-	Amino-
NPS-	ortho-Nitrophenylsulphenyl- ()
-OMe	-Methylester (R-C-O-CH ₃)
Orn	Ornithin
-OSu	-Succinimidester ()
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
Pe(2)OH	Pentan(-2)-ol
i-PropOH	iso-Propanol
PU	Peptiduntereinheit
Pyr	Pyridin
Rham	Rhamnose
RNase	Ribonuclease
Ser	Serin
SuOH	N-Hydroxysuccinimid
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
TSE	Tannierte Schafserythrozyten
Z-	Benzyloxycarbonyl-, N-Carbobenzoxo-
ZW	Zellwand
ZW-TES	Trichloressigsäure-extrahierte Zellwand
ZW-tryp	tryptisch gereinigte Zellwand
<u>B.</u>	<u>Bacillus</u>
<u>Mb.</u>	<u>Microbacterium</u>
<u>Mc.</u>	<u>Micrococcus</u>

S.

Staphylococcus

Str.

Streptococcus

Inhaltsverzeichnis

=====

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	8
1. Organismen	8
2. Nährmedien	11
3. Kulturbedingungen und Anzucht von Bakterien	11
4. Präparation von Peptidoglycan für die immunologischen Versuche	13
4.1. Gewinnung der Zellwände	13
4.2. Extraktion der Teichonsäuren	13
4.3. Solubilisierung von Peptidoglycan durch Behandlung mit Ultraschall	13
4.4. Schnellpräparation von Peptidoglycan für schnelles serologisches Screening des Zellwandtyps	13
5. Reinigung und Solubilisierung von Chitin zur Verwendung als Antigen	14
6. Aminosäuren, Aminosäurederivate, Peptide und deren Derivate	15
7. Synthese von Gly-L-Ala ₂ -D-Ala ₂	16
7.1. Boc-D-Ala	16
7.2. Boc-Gly	17
7.3. Boc-D-Ala-Polymer	18
7.4. Gly-L-Ala ₂ -D-Ala ₂ -Polymer	18
7.5. Abspaltung des Peptids vom Polymer	19
8. Synthese der Protein-Peptid-Konjugate mit Peptidketten mit freien Carboxylgruppen - Protein-(CH ₂ CO-Gly-L-Ala ₂ -D-Ala ₂) _n ; - Protein-(CH ₂ CO-Gly ₅) _n ; - Protein-(CH ₂ CO-L-Ala ₅) _n ;	22
8.1. Jodacetylsuccinimidester	22
8.2. JAc-Gly ₅ ; JAc-L-Ala ₅ ; JAc-Gly-L-Ala ₂ -D-Ala ₂	22

8.3. Kopplung der Peptide an die Trägerproteine	23
9. Synthese der Konjugate (L-Ala ₃ -ε-Acp) ₂₂ -HSA und (L-Ala ₃ -ε-Acp) ₁₁ -RNase (N-terminales L-Alanin)	24
9.1. Z-L-Ala ₂ -OSu	24
9.2. Z-L-Ala ₂ -ε-Acp	25
9.3. L-Ala ₂ -ε-Acp	25
9.4. NPS-L-Ala	26
9.5. NPS-L-Ala-OSu	27
9.6. NPS-L-Ala ₃ -ε-Acp	27
9.7. NPS-L-Ala ₃ -ε-Acp-OSu	28
9.8. (NPS-L-Ala ₃ -ε-Acp) ₁₁ -RNase und (NPS-L-Ala ₃ -ε-Acp) ₂₂ -HSA	28
9.9. (L-Ala ₃ -ε-Acp) ₁₁ -RNase und (L-Ala ₃ -ε-Acp) ₂₂ -HSA	29
10. Synthese der Konjugate (Gly ₅ -ε-Acp) ₂₀ -HSA und (Gly ₅ -ε-Acp) ₁₀ -RNase (N-terminales Glycin)	30
11. Synthese des Konjugats (L-Ala-Gly ₄) ₁₁ -RNase (N-terminales L-Alanin)	32
12. Darstellung von Sepharose-4B-(Gly ₅) _n (C-terminales Glycin)	34
13. Acetylierung und Formylierung von Aminosäuren und Peptiden	34
13.1. Acetyl-D-Alanin	34
13.2. Acetyl-Triglycin und Acetyl-Pentaglycin	35
13.3. Ac ₂ -L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala ₂ , Ac ₂ -L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala, Ac ₂ -Gly-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala ₂	36
13.4. For-L-Ala-D-Ala, For-L-Ala-D-Ala-Gly	36
14. Methylveresterung von Aminosäuren und Peptiden	37
14.1. D-Alaninmethylester	37
14.2. Triglycinmethylester und Pentaglycinmethylester	37
15. L-Ala ₃ -ε-Acp, Gly ₅ -ε-Acp und L-Ala-Gly ₄	38
16. L-Ala ₂ -Gly, L-Ala-D-Ala-Gly, L-Ala-Gly-L-Ala und Gly-L-Ala-Gly	40
17. Synthese des Peptids D-Ala ₂ -Gly	41
17.1. Boc-D-Ala-OSu	41
17.2. Boc-D-Ala-D-Ala-Gly	41
17.3. D-Ala ₂ -Gly	41

18. Mono- und Oligosaccharide und deren Derivate	42
18.1. N-Acetyl-D-Muraminsäureäthylamid	42
18.2. Acetylchitobiose und Acetylchitotetraose	43
18.3. GlcNAc-MurNAc und GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc	43
18.3.1. Isolierung von tryptisch gereinigter Zellwand von <u>Mc. luteus</u>	43
18.3.2. Hydrolyse der Zellwände mit Lysozym	43
18.3.3. Dialyse der Zellwandhydrolysate von 18.3.2.	44
18.3.4. Chromatographie des Dialysats an Amberlite CG 120	44
18.3.5. Gelchromatographie des Eluats von 18.3.4. an Sepha- dex G-15	44
19. Hydrolyse	44
20. Elektrophoretische Methoden	45
20.1. Dünnschichtelektrophorese	45
20.2. Papierhochspannungselektrophorese	46
21. Chromatographische Methoden	46
21.1. Dünnschichtchromatographie	46
21.2. Papierchromatographie	47
21.3. Sprühmittel zur Identifizierung der chromatographierten Verbindungen	48
21.4. Ionenaustauschchromatographie	50
21.4.1. Chromatographie an Dowex 50	50
21.4.2. Chromatographie an Dowex 1	51
21.4.3. Chromatographie an Amberlite IR 4B	52
21.4.4. Chromatographie von Lysozym-hydrolysiertem, dialy- sierbarem Peptidoglycan von <u>Mc. luteus</u> an Amberlite CG 120	52
21.5. Gelchromatographie an Sephadex	53
21.5.1. Gelchromatographie von $(L-Ala_3-\epsilon-Acp)_n$ -Protein, $(Gly_5-\epsilon-Acp)_n$ -Protein und $(L-Ala-Gly_4)_{11}$ -RNase an Sephadex G-25	53
21.5.2. Chromatographie von $L-Ala_3-\epsilon-Acp$, $Gly_5-\epsilon-Acp$, $L-Ala-$ Gly_4 , $Gly-L-Ala-Gly$, $L-Ala_2-Gly$ und $L-Ala-Gly-L-Ala$ an Sephadex G-15	53

21.5.3. Chromatographie von GlcNAc-MurNAc und von GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc an Sephadex G-15	53
22. Inkubation von GlcNAc-MurNAc und von GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc mit Lysozym	54
23. Bestimmung von reduzierenden Gruppen nach der Ferricyanid-methode	54
24. Bestimmung von Aminosuckern mit dem Morgan-Elson-Reagenz	55
25. Hydrazinolyse	55
26. Dinitrophenylierung	55
26.1. Dinitrophenylierung der als Trägerproteine verwendeten Proteine sowie der Peptidyl-Protein-Konjugate	55
26.2. Dinitrophenylierung von Zellwänden	56
26.3. Quantitative Bestimmung N-terminaler Gruppen in Spaltprodukten Lysozym-behandelter Zellwände	56
27. Desaminierung der als Trägerproteine verwendeten Proteine sowie der Peptidyl-Proteine	56
28. Quantitative Bestimmung von D-Aminosäuren	56
29. Absolutierung und Hochreinigung von Lösungsmitteln; Darstellung von speziellen Reagenzien	57
30. Analytische Methoden	58
31. Proteinbestimmung	59
31.1. Photometrische Bestimmung	59
31.2. Bestimmung mit dem Folin-Ciocalteus-Reagenz	59
32. Antiseren	60
33. Isolierung von γ -Globulin aus Kaninchen-Antiseren	62
33.1. Ausfällung der γ -Globuline mit Ammoniumsulfat	62
33.2. Abtrennung der γ -Globulinfraktion von anderen Serum-Proteinen durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	62
34. Fraktionierung der Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine - Abtrennung der gegen die Trägerproteine gerichteten Antikörper	63
35. Immunaффinitätschromatographie	64

36. Agglutinationstests	64
36.1. Titration mittels passiver Hämagglutination (BDB- Technik)	64
36.2. Latex-Agglutinationstest	66
37. Präzipitationstests	67
37.1. Kapillarpräzipitationstest	67
37.2. Agargelpräzipitation nach Ouchterlony	67
37.3. Quantitativer Präzipitationstest	67
37.4. Quantitativer Präzipitations-Hemmungstest	68
III. Zur Spezifität der "Anti-Glycanstrang-Antikörper"	69
Problemstellung	69
Ergebnisse	72
1. Synthese bzw. Isolierung nicht kommerziell erhältlicher Oligosaccharide bzw. Zuckerderivate	72
1.1. Acetyl-D-Muraminsäureäthylamid	72
1.2. GlcNAc und GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc	75
1.3. N-Acetyl-Chitobiose und N-Acetyl-Chitotetraose	78
2. Untersuchung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwi- schen Antiseren gegen <u>Micrococcus luteus</u> sowie <u>Streptococcus</u> A-variant und verschiedenen Glycan-Antigenen	79
3. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktionen zwischen Antiseren gegen <u>Streptococcus</u> A-variant sowie gegen <u>Micro-</u> <u>coccus luteus</u> und verschiedenen Glycan-Antigenen	85
Diskussion	93
IV. Antikörper gegen synthetische Antigene mit struktureller Ähnlichkeit zu den Interpeptidbrücken verschiedener Gram- positiver Kokken und ihre Anwendung in der Bakteriendiffe- renzierung	104
Problemstellung	104
Ergebnisse	111
Spezifische Antikörper gegen Interpeptidbrückenpeptide mit freien Carboxylgruppen	111
1. Synthese der Protein-Peptid-Konjugate mit Peptidketten mit freien α -Carboxylgruppen	111
2. Antiseren gegen HSA-(CH ₂ CO-Gly ₅) ₃₁	113

2.1. Hämagglutination und quantitative Präzipitation der HSA-(CH ₂ CO-Gly ₅) ₃₁ -Antiseren mit verschiedenen Proteinen und synthetischen Antigenen	113
2.2. Spezifität der "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper"	116
2.3. Reaktion der "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" mit Peptidoglycanen verschiedener Primärstruktur	119
2.3.1. Latex-Agglutination	119
2.3.2. Quantitative Präzipitationsreaktion	121
2.4. Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktionen zwischen "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" und Peptidoglycan von <u>Staphylococcus aureus</u> H	123
3. Antikörper gegen die Pentaglycin-Interpeptidbrücken in Hyperimmunseren gegen <u>Staphylococcus aureus</u>	125
Spezifische Antikörper gegen Interpeptidbrückenpeptide mit freien Aminogruppen	127
1. Synthese der Peptidyl-Proteine mit Peptidketten mit freien Aminogruppen	127
2. Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine (Gly ₅ -ε-Acp) ₂₀ -HSA, (L-Ala ₃ -ε-Acp) ₂₂ -HSA und (L-Ala-Gly ₄) ₁₁ -RNase	130
2.1. passive Hämagglutination und Kapillarpräzipitation	130
2.2. Nachweis der Spezifität der Antiseren gegen (Gly ₅ -ε-Acp) ₂₀ -HSA, (L-Ala ₃ -ε-Acp) ₂₂ -HSA und (L-Ala-Gly ₄) ₁₁ -RNase in der quantitativen Präzipitationshemmung	134
2.3. Reaktion der Antiseren gegen die synthetischen Peptidyl-Proteine mit Peptidoglycanen verschiedener Primärstrukturen	141
2.4. Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen den Peptidyl-Protein-Antiseren und Peptidoglycan	149
3. Screeningtest zur Bestimmung des Peptidoglycantyps an ganzen Bakterienzellen	149
4. Spezifische Antikörper gegen die Interpeptidbrücke in Antiseren gegen ganze Bakterienzellen	152
4.1. Antiseren gegen <u>Streptococcus</u> A-variant	153
4.2. Antiseren gegen <u>Staphylococcus aureus</u> 52A5	155

Diskussion	162
V. Zusammenfassung	177
VI. Literaturverzeichnis	181

Die Immunchemie des Peptidoglycans

I. Einleitung

=====

Peptidoglycan, in der Literatur oft auch als Mucopeptid oder Murein bezeichnet, findet sich als charakteristischer Zellwandbestandteil bei fast allen Prokaryonten. Es handelt sich um ein Heteropolymer, das sich aus unverzweigten, durch kurze Peptidketten quervernetzten Polysaccharidsträngen aufbaut (26,92,119). Durch die Verknüpfung der Peptidketten benachbarter Zuckerstränge entsteht das dreidimensionale sacculusförmige Makromolekül, das die Bakterienzelle umhüllt und für die Formbeständigkeit und osmotische Stabilität der Zelle verantwortlich ist.

Der Polysaccharidanteil des Peptidoglycans baut sich aus N-acetyliertem D-Glucosamin und N-acetylierter D-Muraminsäure (3-O-D-Milchsäureäther des N-Acetyl-D-Glucosamins) auf; beide Bausteine alternieren in β -1,4-glycosidischer Verknüpfung (21,22,25,67,134,149). Die freie Carboxylgruppe der Muraminsäure ist in der Regel mit einem Peptid substituiert, das alternierend L- und D-Aminosäuren enthält und sich, der Reihenfolge nach, aus den Aminosäuren L-Alanin, D-Glutaminsäure, L-Diaminosäure und D-Alanin zusammensetzt. Dieses Peptid, im Normalfall ein Tetrapeptid, nennt man die Peptiduntereinheit des Peptidoglycans. Die Peptiduntereinheiten zweier benachbarter Zuckerstränge können miteinander verknüpft sein und auf diese Weise die Glycanstränge quervernetzen. Diese Quervernetzung kann nun, wie bei wahrscheinlich allen Gram-negativen

Bakterien, direkt zwischen der freien Aminogruppe der Diaminosäure in Position 3 der Peptiduntereinheit und der Carboxylgruppe eines D-Alanins in Position 4' eines benachbarten Peptids erfolgen (164). Dagegen weist das Peptidoglycan vieler Gram-positiver Bakterien charakteristische "Interpeptidbrücken" auf, die zwischen die Peptiduntereinheiten eingeschoben sind und aus einer bis sechs Aminosäuren bestehen (23, Abbildung 1).

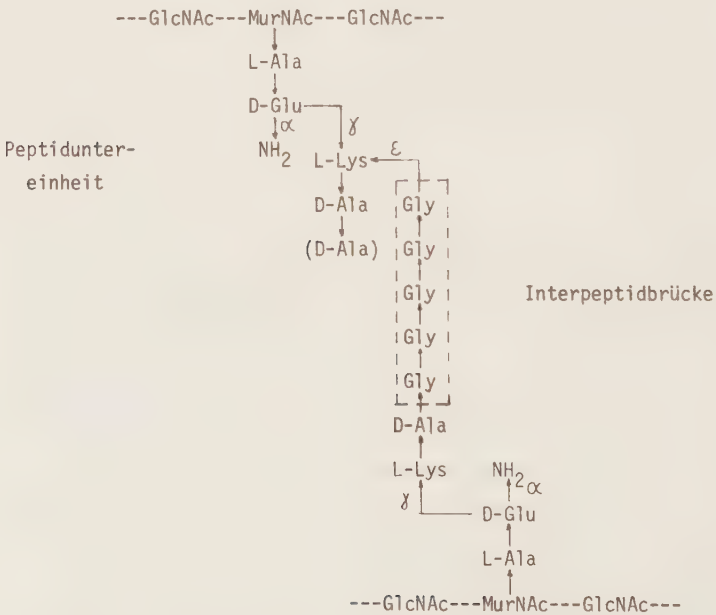


Abbildung 1. Ausschnitt aus der Primärstruktur des Peptidoglycans von Staphylococcus aureus Copenhagen

Die Zusammensetzung und Sequenz dieser Interpeptidbrücken zeigt innerhalb der Gram-positiven Bakterien eine große Variation, sie ist jedoch meist innerhalb einzelner Gattungen oder Arten konstant. Deshalb bildet

der "Peptidoglycantyp" als art- bzw. gattungsspezifische Eigenschaft ein ausgezeichnetes chemotaxonomisches Kriterium für die Klassifizierung der Gram-positiven Bakterien. Die Primärstruktur des Peptidoglycans eignet sich auf Grund ihrer Konservativität besonders als chemotaxonomisches Merkmal. Veränderungen durch Mutationen treten selten auf, da die Peptidoglycanstruktur nicht wie die Struktur eines Proteins von einem Gen bestimmt wird, sondern das Produkt des Zusammenwirkens vieler Gene darstellt. Eine Übersicht über die verschiedenen bei Bakterien vorkommenden Peptidoglycantypen und ihre taxonomische Bedeutung findet sich in einem Übersichtsartikel von Schleifer und Kandler (119).

Bis vor wenigen Jahren sah man in der strukturerhaltenden Funktion des Peptidoglycans seine ausschließliche Bedeutung und hielt Peptidoglycane für biologisch indifferent. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre zeigten jedoch, daß es sich durchaus nicht um inerte, sondern um biologisch hochaktive Substanzen handelt. Im wesentlichen weisen Peptidoglycane vier Gruppen von biologischen Aktivitäten auf (44):

1. Endotoxinähnliche Wirkungen: Pyrogenität, Auslösung der lokalen Schwartzman-Reaktion, Steigerung der unspezifischen Resistenz gegen bakterielle Infektionen, Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin aus Trombocyten, Aktivierung von Komplement, Gelierung von Amöbocyten-Lysat.
2. Entzündliche Reaktionen der Haut und der inneren Organe, Hemmung der Bakterienphagocytose bei Granulocyten und Makrophagen, Cytotoxizität gegenüber Granulocyten und Makrophagen.
3. Potenzierung der humoralen und zellulären Immunantwort (Adjuvans-Wirksamkeit), Förderung der Tumorabwehr im Tierexperiment.
4. Immunogenität (Stimulierung der Bildung spezifischer Antikörper).

Seit der Entdeckung der Immunogenität von Peptidoglycan (1) erschien eine große Anzahl Arbeiten über dessen antigene Eigenschaften (47,48, 50,55-59,102,117,118). Spezifische Antikörper gegen Peptidoglycan ließen sich sogar in Präimmunseren vieler Versuchstiere und im Serum gesunder menschlicher Blutspender nachweisen (1,45,105,129).

Die Untersuchung der Spezifität der gegen Peptidoglycan gerichteten Antikörper zeigte, daß sowohl der Polysaccharidstrang als auch der Peptidteil des Peptidoglycans antigene Eigenschaften besitzt. Seit den Untersuchungen Landsteiners, Paulings und Westphals (53) zur Antikörperspezifität gilt in der Immunologie die allgemeine Erkenntnis gesichert, daß Antikörper nicht gegen ein makromolekulares Antigen als Ganzes gerichtet sind, sondern gegen niedermolekulare, definierte Struktureinheiten auf der Oberfläche des Antigens, die determinanten Gruppen. Weiter entwickelte sich die Vorstellung, daß Antigene sehr häufig aus zwei sich funktionell unterscheidenden Anteilen bestehen: der hochmolekulare Träger ist verantwortlich für die Immunogenität, d.h. für die Stimulierung der Antikörperbildung, während die determinanten Gruppen die Spezifität des Antikörpers bestimmen. Die niedermolekularen Verbindungen, die am intakten Antigen als determinante Gruppen fungieren können, sind für sich allein nicht in der Lage, nach Injektion die Bildung von Anti-

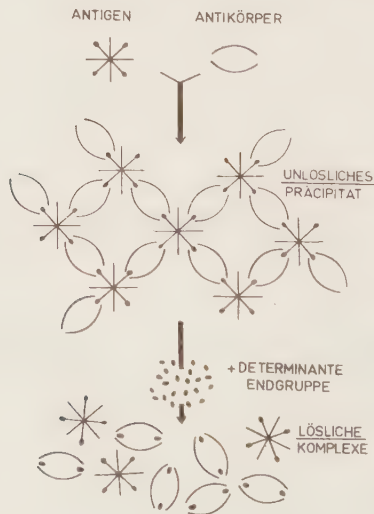


Abbildung 2. Das bivalente lösliche Antikörpermolekül reagiert hochspezifisch mit den determinanten Gruppen auf der Oberfläche

des multivalenten Antigens unter Bildung unlöslicher Präzipitate. Die Gegenwart der monovalenten, niedermolekularen determinanten Gruppen des Antigens führt zu Präzipitationshemmung (nach Drews (17)).

körpern auszulösen. Sie können aber von bereits vorhandenen homologen Antikörpern gebunden werden. Man bezeichnet solche serologisch aktiven, aber selbst nicht immunogenen Substanzen als Haptene. Haptene können, im Überschuß zu unlöslichem Antigen-Antikörper-Präzipitat zugegeben, das Antigen aus dem Antigen-Antikörper-Komplex verdrängen und so zur Auflösung des Präzipitats führen (vgl. Abbildung 2, Seite 4).

Diese Hemmung der Präzipitationsreaktion mit Haptenen stellt in der Immunchemie ein wichtiges methodisches Hilfsmittel zur Aufklärung der determinanten Gruppen immunogener Makromoleküle dar. Für Peptidoglycan konnten bisher drei antigene Determinanten näher definiert werden:

1) Anteile des Glycanpolymers

Als immunodominanten Zucker geben verschiedene Arbeitskreise voneinander abweichend N-Acetyl-Glucosamin bzw. N-Acetyl-Muraminsäure an (57,102,167,168).

2) die bei Gram-positiven Bakterien vorkommende Interpeptidbrücke

Helgeland et al. (41), Hisatsune et al. (48) und Ranu (99) erhielten Hinweise, daß die Pentaglycinbrücke von Staphylococcus aureus ebenfalls die Bildung spezifischer Antikörper bestimmt.

3) das nicht an der Quervernetzung beteiligte Penta-peptid der Peptiduntereinheit mit C-terminalem D-Alanyl-D-Alanin

Schleifer und Krause (117,118) hemmten die Präzipitationsreaktion zwischen Peptidoglycan und Peptidoglycan-Antiserum mit verschiedenen synthetischen Peptiden mit struktureller Ähnlichkeit zur Peptiduntereinheit des Peptidoglycans. Aus den Ergebnissen der Hemmversuche zogen sie die folgenden Schlußfolgerungen:

- a) Das Penta-peptid L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala und nicht das weit häufiger vorkommende Tetra-peptid L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala ist die

antigene Determinante der Peptiduntereinheit des Peptidoglycans.

- b) Die Antikörper sind gegen den C-terminalen Bereich des Peptids gerichtet.
- c) Das C-terminale D-Alanyl-D-Alanin stellt die immundominante Gruppe des Antigens dar.
- d) Die anderen Aminosäuren tragen zur Wechselwirkung zwischen Antikörper und Peptidoglycan geringer (L-Lys, D-Glu) oder nur unbedeutend bei (L-Ala).
- e) Der Bindungsbereich der Antikörpermoleküle ist maximal auf die Größe eines Tetra- bis Pentapeptids eingestellt.

Die Verwendung synthetischer Antigene bestätigte diese Ergebnisse. Synthetische Antigene lassen sich durch Kopplung niedermolekularer Substanzen an makromolekulare Träger wie Proteine, Erythrozyten oder synthetische Polypeptide herstellen (103). Versuchstiere bilden nach Immunisierung mit solchen synthetischen Konjugaten neben Antikörpern gegen das Trägermolekül auch Antikörper, die spezifisch gegen die eingeführte niedermolekulare Verbindung gerichtet sind. Mit dieser Methode konnten bereits gegen zahlreiche Moleküle, die für sich alleine nicht immunogen sind, Antikörper gebildet werden (Penicillin und dessen Derivate, Steroide, Hormone, aromatische Verbindungen, Zucker). Haimovich et al. (35), Sage et al. (104) und Schechter et al. (107-109) beschreiben Antikörper, die durch Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen Protein-Peptid-Konjugaten erhalten wurden und die spezifisch gegen die eingeführten Peptidketten gerichtet sind. Zeiger und Maurer (171) sowie Schleifer und Seidl (122,133) beschreiben synthetische Antigene, die als antigene Determinante Peptide aufweisen, die dem Pentapeptid der Peptiduntereinheit sehr ähneln und die wie dieses C-terminale D-Alanyl-D-Alanin besitzen. Durch Immunisierung von Kaninchen mit solchen Konjugaten konnten Antikörper erhalten werden, die spezifisch mit Peptidoglycanen von Bakterien kreuzreagieren, die in ihren Peptiduntereinheiten Pentapeptide mit C-terminalem D-Alanyl-D-Alanin aufweisen.

Die vorliegende Arbeit, die sich in zwei Abschnitte gliedert, soll fol-

gende Beiträge zur Immunchemie des Peptidoglycans leisten:

1. Zur Spezifität der "Anti-Glycanstrang-Antikörper"

Die Spezifität der gegen den Glycanstrang des Peptidoglycans gerichteten Antikörper wird eingehend untersucht, die immundominanten Zucker sollen definiert und die maximale Größe des Bindungsbereichs der Antikörpermoleküle angegeben werden.

2. Antikörper gegen synthetische Antigene mit struktureller Ähnlichkeit zu den Interpeptidbrücken verschiedener Gram-positiver Kokken und ihre Anwendung in der Bakteriendifferenzierung

Die bei Mikrokokken und Streptokokken bzw. Staphylokokken vorkommenden Oligo-L-Alanin- bzw. Oligo-Glycin-Interpeptidbrücken werden synthetisch dargestellt und an Trägerproteine gekoppelt. Durch Immunisierung von Kaninchen mit diesen synthetischen Antigenen sollen dann spezifische Anti-Interpeptidbrücken-Antikörper erzeugt werden, die eine serologische Differenzierung verschiedener Bakteriengattungen auf Grund ihrer Peptidoglycan-Primärstrukturen ermöglichen sollen. Die Ausarbeitung eines schnellen und einfachen "Screening-Tests" zur Ermittlung des Peptidoglycantyps ganzer Bakterienzellen soll versucht werden.

II. Material und Methoden

1. Organismen

Die in den immunologischen Versuchen verwendeten Bakterienstämme sowie ihre Herkunft sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Untersuchte Organismen und ihre Herkunft

<u>Gattung</u>	<u>Species</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Stammbezeichnung</u>
Bacillus	subtilis	Archibald	W 23
Microbacterium	lacticum	IMRU	IMRU 630
Micrococcus	agilis	CCM	CCM 2390
Micrococcus	kristinae	ATCC	ATCC 27570
Micrococcus	luteus	CCM	CCM 169
Micrococcus	lylae	ATCC	ATCC 27566
Micrococcus	nishinomiyensis	Kloos	JL 5
Micrococcus	radiodurans	Kocur	--
Micrococcus	roseus	Back	H 15
"Micrococcus"	"roseus"	CCM	CCM 168
Micrococcus	roseus	CCM	CCM 189
"Micrococcus"	"roseus"	CCM	CCM 1405
Micrococcus	roseus	CCM	CCM 1679
Micrococcus	roseus	ATCC	ATCC 418
Micrococcus	sedentarius	CCM	CCM 314
Micrococcus	sedentarius	Kloos	BH 252
Micrococcus	sedentarius	Kloos	DM 51
Micrococcus	sedentarius	Kloos	TW 93
Micrococcus	variens	CCM	CCM 418

Gattung	Species	Herkunft	Stammbezeichnung
Micrococcus	varians	CCM	CCM 884
Staphylococcus	aureus	ATCC	ATCC 12600
Staphylococcus	aureus	ATCC	ATCC 12601
Staphylococcus	aureus	Ghuysen	Copenhagen
Staphylococcus	aureus	Baddiley	H
Staphylococcus	aureus	Grov	Cowan I
Staphylococcus	aureus	Mirelman	52A5
Staphylococcus	capitis	ATCC	ATCC 27840
Staphylococcus	cohnii	DSM	DSM 20260
Staphylococcus	epidermidis	ATCC	ATCC 14990
Staphylococcus	haemolyticus	DSM	DSM 20264
Staphylococcus	hominis	ATCC	ATCC 27844
Staphylococcus	hominis	Kloos	JL 248
Staphylococcus	lactis	Baddiley	I 3
Staphylococcus	saprophyticus	CCM	CCM 883
Staphylococcus	sciuri	ATCC	ATCC 29062
Staphylococcus	simulans	ATCC	ATCC 27848
Staphylococcus	species	CCM	CCM 2495
Staphylococcus	species	CCM	CCM 2574
Staphylococcus	xylosus	DSM	DSM 20266
Staphylococcus	xylosus	Kloos	AW 124
Staphylococcus	warneri	ATCC	ATCC 27836
Streptococcus	agalactiae	Kiel	25886
Streptococcus	A-variant	Lancefield	A 486
Streptococcus	bovis	Kiel	25794
Streptococcus	cremoris	Schleifer	316 a (111)
Streptococcus	dysgalactiae	Kiel	220
Streptococcus	faecalis	Kiel	11788
Streptococcus	faecalis	ATCC	ATCC 13399
Streptococcus	faecium	Kiel	11750
Streptococcus	faecium	Kiel	11717

Gattung	Species	Herkunft	Stammbezeichnung
Streptococcus	mutans	Kiel	25859
Streptococcus	pyogenes	Kiel	4875
Streptococcus	salivarius	Kiel	21372
Streptococcus	salivarius	Kiel	21367
Streptococcus	species	Kiel	13272
Streptococcus	species	Kiel	21361
Streptococcus	species	Kiel	25926
Streptococcus	uberis	Kiel	21342
Streptococcus	viridans I	Kiel	104
Streptococcus	viridans IV	Kiel	7733

- Archibald = A.R. Archibald, University of Newcastle upon Tyne, G.B.
- ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
- Baddiley = J. Baddiley, University of Newcastle upon Tyne, G.B.
- Back = W. Back, Institut für Brauereitechnologie und Mikrobiologie, Freising-Weihenstephan, BRD
- CCM = Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno, CSSR
- DSM = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, München, BRD
- Ghuysen = J.M. Ghuysen, Université de Liège, Belgie
- Grov = A. Grov, The Gade Institute, University of Bergen, Norwegen
- IMRU = Institute of Microbiology, Rutgers University, New Jersey, USA
- Kiel = Institut für Milchhygiene, Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel, BRD
- Kloos = W.E. Kloos, Genetics Department, North Carolina State University, USA
- Kocur = M. Kocur, Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno, CSSR
- Lancefield = R.C. Lancefield, The Rockefeller University, New York, USA

Mirelman = D. Mirelman, The Weizmann Institute, Rehovot, Israel

Schleifer = K.H. Schleifer, TU München, BRD

2. Nährmedien

Hefe-Dextrose-(HD-) Medium

Casein-Pepton (Merck)	10 g/l	Zur Anzucht von Staphylokokken
Hefeextrakt (Merck)	5 g/l	setzte man dem HD-Medium 2 g Gly-
D-Glucose	5 g/l	cin/l zu (121).
NaCl	5 g/l	

Leitungswasser, pH = 7.2

Streptococcus A-variant A 486 züchtete man in Todd-Hewitt-Medium (93).

Das zur Anzucht von Streptococcus cremoris verwendete Medium findet sich in (111) beschrieben.

HD-Agar: Zusammensetzung des Grundmediums wie oben, jedoch zusätzlich 15 g Agar (Serva)/l Medium.

Blutagar-Medium: Dem Grundagar setzte man steril 50 ml steriles, defibriniertes Hammelblut (Oxoid) pro Liter Medium zu.

Die Sterilisation der Medien erfolgte in der Regel im Hochdruckautoklaven bei 1 atm und 121 °C für 20-30 Minuten.

3. Kulturbedingungen und Anzucht der Bakterien

Die lyophilisierten Ausgangskulturen wurden in etwa 0.5 ml HD-Medium suspendiert, auf HD-Agarplatten ausgestrichen und diese bei 37 °C bebrütet. Streptococcus A-variant wurde im Anaerobiertopf in einer Atmosphäre von 90 % Stickstoff und 10 % CO₂ angezogen. Die so erhaltenen Einzelkolonien dienten nach mikroskopischer Überprüfung auf morphologische Einheitlichkeit zum Beimpfen von Vorkulturen.

Vorkulturen

Die jeweils 30 ml HD-Bouillon enthaltenden 100 ml Erlenmeyerkölbchen wurden beimpft und 18 Stunden bei 37 °C unter Schütteln bebrütet. Die jeweils 50 ml Todd-Hewitt-Bouillon bzw. Nährmedium für Streptococcus cremoris enthaltenden 100 ml Erlenmeyerkölbchen wurden beimpft und zwei Tage bei 37 °C unter Stehenlassen bebrütet.

Bei Kulturen, die auf Schrägagar bzw. im Stichagar gehalten wurden, legte man vor dem Beimpfen der Vorkulturen Plattenverdünnungsausstriche an.

Massenkulturen von Bacillus subtilis, Microbacterium lacticum, Mikrokokken, Staphylokokken und der Streptokokken des Instituts für Milchhygiene

Zur Züchtung von Massenkulturen wurden je 5ml der frischen HD-Vorkultur in je 300 ml HD-Bouillon enthaltende 1 l Erlenmeyerkolben überimpft. Es wurde in der Regel bei 37 °C aerob bebrütet. Bacillus subtilis Kulturen überprüfte man mikroskopisch auf Sporenbildung und erntete vor der Sporulation.

Filterkerzenanzucht zur Gewinnung von Massenkulturen von Micrococcus luteus

15 l Medium in einer 20 l Steilbrustflasche wurden in einem großen Wasserbad auf 37 °C temperiert und über eine Filterkerze mit Druckluft begast. Dem Medium wurde vor dem Autoklavieren 5 ml Silicon-Antischaumemulsion C (Serva) zugegeben. Die Massenkulturen beimpfte man mit 1.8 l Vorkultur.

Massenkulturen von Streptococcus A-variant und Streptococcus cremoris

10 l Todd-Hewitt-Medium bzw. Nährmedium für Streptococcus cremoris (S. 11) in einer 15 l Steilbrustflasche beimpfte man mit 1 l Vorkultur und bebrütete unter Stehenlassen bei 37 °C.

Alle Kulturen wurden mikroskopisch und durch Verdünnungsausstriche auf etwaige Infektionen überprüft.

4. Präparation von Peptidoglycan für die immunologischen Versuche

4.1. Gewinnung der Zellwände (110)

Die Isolierung der Zellwände nach der Methode von Schleifer und Kandler (110) findet sich in zahlreichen Dissertationen aus dem Arbeitskreis (37,87,156) ausführlich beschrieben.

4.2. Extraktion der Teichonsäuren (117)

Die Teichonsäuren wurden aus den tryptisch gereinigten Zellwänden durch acht-stündige Extraktion bei 60 °C mit 10-%-iger Trichloressigsäure (5 mg ZW-tryp/ml) entfernt. Nach beendeter Inkubation wurde der Ansatz 20 Minuten bei 48000 g zentrifugiert und das Sediment (ZW-TES) mit Aqua dest. gewaschen, bis der pH des Überstands neutral war.

4.3. Solubilisierung von Peptidoglycan durch Behandlung mit Ultraschall

(117, modifiziert)

Peptidoglycan suspendierte man mit dem Ultraturrax in destilliertem Wasser (10 mg/ml), kühlte im Eisbad und beschallte unter Eiskühlung 20-40 Minuten mit einem 1000 Watt Ultraschallgerät der Firma MSE bei 20 bis 22 kc/s. Unlösliches Material zentrifugierte man ab (48000 g, 30 Minuten), den Überstand dialysierte man zur Entfernung von niedermolekularem Material mehrmals gegen Aqua dest., und stellte dann auf pH 7.0 ein. Die Konservierung der Zellwand-Mikrosuspensionen erfolgte durch Zugabe von 0.05 % Natriumazid, 0.02 % Merthiolat und einiger Tropfen Toluol. Zur Feststellung der Konzentration des solubilisierten Peptidoglycans wurde ein Aliquot lyophilisiert.

4.4. Schnellpräparation von Peptidoglycan für schnelles serologisches

Screening des Zellwandtyps

HD-Bouillonröhrchen mit je 10 ml Medium beimpfte man und bebrütete über

Nacht (15 h) bei 37 °C unter Schütteln. Nach Zentrifugation der Bakterien isolierte man das Peptidoglycan nach der bei Schleifer und Kandler (119) ausführlich beschriebenen Schnellmethode.

5. Reinigung und Solubilisierung von Chitin zur Verwendung als Antigen

(52)

Je 1 g Chitin (Roth) behandelte man nacheinander wie folgt:

- 30 Minuten in 50 ml 1 N HCl rühren, abzentrifugieren;
- durchmischen mit 50 ml Aqua dest., abzentrifugieren;
- 20 Minuten in 0.5 N NaOH bei 100 °C rühren, abkühlen, abzentrifugieren; durchmischen mit 50 ml Aqua dest., abzentrifugieren;
- durchmischen mit 50 ml 0.5 prozentiger Kaliumpermanganatlösung, 20 Minuten bei 60 °C rühren, abkühlen, abzentrifugieren;
- 20 Minuten rühren in 50 ml kalter, halbgesättigter Natriumbisulfitlösung (27 g/100 ml), abzentrifugieren;
- 2 x 20 Minuten rühren in 50 ml Aqua dest. bei 100 °C, abkühlen, abzentrifugieren;
- 20 Minuten in 50 ml Äthanol rühren, abzentrifugieren;

Das Sediment suspendierte man mit dem Ultraturrax in 20 ml Aqua dest., kühlte im Eisbad und beschallte unter Eiskühlung 20 Minuten mit einem 1000 Watt Ultraschallgerät von MSE bei 20 bis 22 kc/s. Zur Entfernung von niedermolekularem Material dialysierte man mehrmals gegen Aqua dest. Unter Rühren addierte man dann zu der Suspension langsam 32 ml konzentrierte Schwefelsäure, wobei die Temperatur unter 10 °C gehalten wurde. Die entstandene viskose Suspension filtrierte man durch Glaswolle in 400 ml Aqua dest., das konstant gerührt wurde. Den feinen Niederschlag zentrifugierte man ab (48000 g, 30 Minuten), wusch viermal mit Aqua dest. und suspendierte dann in wenig Aqua dest., dem zur Konservierung 0.05 % Natriumazid, 0.02 % Merthiolat und einige Tropfen Chloroform zugegeben wurden. Zur Feststellung der Konzentration der Chitin-Suspension lyophilisierte man ein Aliquot.

6. Aminosäuren, Aminosäurederivate, Peptide und deren Derivate

Die Herkunft der verwendeten Verbindungen wird nachfolgend angegeben:

Tabelle 2. Verwendete Aminosäuren, Peptide und Derivate

1)	D-Ala-D-Ala	D-Ala-D-Ala-D-Ala		
2)	Ac-D-Ala	Ac ₂ -L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala		
	L-Ala-L-Ala-Gly	Ac ₂ -L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala		
	L-Ala-D-Ala-Gly	Ac ₂ -Gly-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala		
	D-Ala-D-Ala-Gly	Gly-L-Ala-L-Ala-D-Ala-D-Ala		
	L-Ala-Gly-L-Ala	Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-ε-Acp		
	D-Ala-OMe	Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-OMe		
	Ac-Gly-Gly-Gly	L-Ala-L-Ala-L-Ala-ε-Acp		
	For-L-Ala-D-Ala	Ac-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	L-Ala-L-Ala-ε-Acp	
	Boc-D-Ala	L-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly	Gly-L-Ala-Gly	
	Boc-Gly	Gly-Gly-Gly-Gly-ε-Acp	L-Ala-D-Ala-Gly-OMe	
	Gly-Gly-Gly-OMe	For-L-Ala-D-Ala-Gly		
3)	Boc-L-Ala	Z-Trp	L-Ala-Gly	NPS-Gly·DCHA
	NPS-L-Ala·DCHA	D-Ala	Z-Gly-OSu	Z-L-Ala-L-Ala
4)	L-Ala-OMe	Gly-L-Ala		
5)	L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala	L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala		
	Gly-Gly-L-Ala-L-Ala-D-Ala	Gly-γ-D-Glu-L-Ala-D-Ala-D-Ala		
	Gly-Gly-L-Ala-D-Ala-D-Ala	Gly-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala		
6)	L-Ala-D-Ala	D-Ala-Gly		

7)	L-Ala Ac-L-Ala Gly-L-Ser Ac-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ser-Gly L-Ala-L-Ala L-Ala-Gly-Gly	Gly-Gly-L-Ala L-Ala-L-Ala-L-Ala L-Ala-L-Ala-L-Ala-OMe	Gly-L-Ala-L-Ala
8)	Ac-Gly ε-Acp Gly Gly-Gly-Gly-Gly	Gly-Gly Gly-OMe Gly-Gly-Gly	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala Gly-Gly-Gly-Gly-Gly L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	
9)	Gly-L-Thr L-Ala-L-Thr	L-Ser-Gly-Gly Gly-Gly-L-Ser	Gly-Gly-Gly-Gly-L-Ala L-Ser-L-Ala	
10)	Gly-L-Ser-Gly			

1) = Cyclo; 2) = eigene Synthese; 3) = Fluka; 4) = Merck-Schuchardt;
 5) = Schleifer (117); 6) = Institut für Organische Chemie, Technische
 Universität München; 7) = Sigma; 8) = Serva; 9) = Fox; 10) = NBC;

7. Synthese des Peptids Gly-L-Ala-L-Ala-D-Ala-D-Ala

Die Synthese dieses Peptids erfolgte nach der Methode von Merrifield (77-80,142), ähnlich wie bei Seidl (132) beschrieben.

7.1. Synthese von Boc-D-Alanin

Die Synthese der Boc-Aminosäuren nach der Methode von Schwyzer et al. (131) findet sich ausführlich in (142) beschrieben.

Ausbeute: 73 % (Lit. 73 %); Elementaranalyse für $C_8H_{15}NO_4$, MG = 189.22:

berechnet: C 50.78; H 7.99; N 7.40; O 33.83;

gefunden: C 50.52; H 7.98; N 7.54; O 33.96;

Schmelzpunkt: 81-82 °C (Lit. 81-82 °C); spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = 25 \pm 0.5$; (c = 2 in Eisessig).

7.2. Synthese von Boc-Glycin (126)

50 mM Glycin suspendierte man in 10 ml Wasser und 10 ml peroxidfreiem Dioxan, addierte 55 mM einer 4 N Boc-azidlösung (Dioxan als Solvens) und titrierte am Autotitrator bei pH 10.0 mit 4 N NaOH. Die Reaktionszeit betrug 8 Stunden. Das Reaktionsgemisch dampfte man im Vacuum ein, löste den Rückstand in Wasser und extrahierte dreimal mit Diäthyläther. Die wässrige Phase wurde mit einer fünfprozentigen Lösung von Kaliumsulfat/Kaliumhydrogensulfat (2:1; pH = 2) auf pH 3 angesäuert (139) und die Boc-Aminosäure mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen extrahierte man ca. zehnmal mit gesättigter Natriumsulfatlösung und trocknete über Magnesiumsulfat, dem Aktivkohle zugesetzt wurde. Dann filtrierte man, dampfte im Vacuum bei 30 °C ein und kristallisierte aus Essigester/Petroläther um.

Ausbeute: 89 % (Lit. 90 %); Elementaranalyse für $C_7H_{13}NO_4$, MG = 175.19:

berechnet: C 47.99; H 7.48; N 7.99; O 36.53;

gefunden: C 48.12; H 7.33; N 8.03; O 36.52;

Schmelzpunkt: 86-88 °C (Lit. 85-89 °C);

Die Dünnschichtchromatographie der synthetisierten Boc-Aminosäuren mit Glycin und Alanin als Referenzsubstanzen ergab die Einheitlichkeit der Verbindungen. Zur Abtrennung von Verunreinigungen durch freie Aminosäuren in gekauften Boc-Aminosäuren (Boc-L-Alanin) löste man in der gerade notwendigen Menge Methylenchlorid, filtrierte ab und engte die Lösung bei 40 °C zur Trockene ein. 5 µM Boc-Glycin bzw. Boc-D-Alanin ergaben keine positive Ninhydrinreaktion (Blockierung der α-Aminogruppe).

Laufmittel	A	B	C	D
Boc-Glycin	$R_f = 0.44$	$R_f = 0.54$	$R_f = 0.57$	$R_f = 0.57$
Boc-D-Alanin	$R_f = 0.48$	$R_f = 0.64$	$R_f = 0.74$	$R_f = 0.60$

Der Nachweis der Substanzflecke erfolgte nach Reindel-Hoppe und mit Ninhydrin nach Abspalten der Schutzgruppe mit HCl. Die mit Ninhydrin und dem Sprühreagenz nach Reindel-Hoppe erhaltenen Flecke waren identisch. In beiden Fällen ergab sich nur ein Fleck.

7.3. Boc-D-Alanyl-Polymer

20 g des chlorierten Harzes wurden in 60 ml wasserfreiem Äthanol/Essigester (1:1) mit 4.5 g Boc-D-Alanin und 3.4 ml Triäthylamin 40 Stunden bei 80 °C gerührt. Dann filtrierte man das Harz ab und wusch dreimal mit Äthanol, Wasser, Methanol und Methylenchlorid. Das Harz suspendierte man in Methylenchlorid und entfernte Feinbestandteile durch dreimaliges Abdekantieren und erneutes Suspendieren in Methylenchlorid. Restliches Lösungsmittel saugte man ab und trocknete das Harz dann im Vacuum. Die Bestimmung des Alaningehalts am Polymer erfolgte durch Aminosäureanalyse nach 24-Stunden-Hydrolyse eines Aliquots Boc-D-Alanyl-Polymers. Als Substitutionsgrad wurde 0.58 μ M D-Alanin/mg Boc-D-Ala-Harz ermittelt. Für die Synthese wurde ein Polystyrolpolymer (Fluka) mit folgenden Eigenschaften verwendet: 2 % quervernetzt mit Divinylbenzol; 200-400 mesh; 3.5 mM Cl/g Harz.

7.4. Gly-L-Ala-L-Ala-D-Ala-D-Ala-Polymer

10 g Boc-D-Alanyl-Harz wurden in das Reaktionsgefäß eingefüllt und mit den einzelnen Boc-Aminosäuren jeweils die in Tabelle 3, Seite 19, aufgeführten Operationen 1) mit 11) durchgeführt.

Die Kopplungsschritte 9) und 10) wurden nach Hagenmaier und Frank (33) so verändert, daß die Aktivierung der N-geschützten Aminosäure getrennt von der eigentlichen Kopplungsreaktion durchgeführt wurde. Das Verhältnis von Boc-Aminosäure am Polymer/Boc-Aminosäure/Dicyclohexylcarbodiimid betrug 1:6:3. Zwei Äquivalente Boc-Aminosäure und ein Äquivalent Dicyclohexylcarbodiimid löste man getrennt in möglichst wenig Methylenchlorid, kühlte auf 0 °C, vereinigte die Lösungen und ließ das Reaktionsgemisch unter gelegentlichem Schütteln eine Stunde stehen. Der gebildete Dicyclohexylharnstoff wurde dann abfiltriert und das Filtrat sofort für

Tabelle 3. Schema der Operationen bei der Merrifield-Peptidsynthese

Schritt			Volumen (ml)	Zeit (min)
1)	Waschen mit Äthanol	(3x)	60	3
2)	Waschen mit CH_2Cl_2	(1x)	60	20
3)	TFA/ CH_2Cl_2 (1:1;v/v)	(2x)	60	10
4)	Waschen mit CH_2Cl_2	(3x)	60	3
5)	Waschen mit Äthanol	(3x)	60	3
6)	Waschen mit CH_2Cl_2	(3x)	60	3
7)	$\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (12:88;v/v)	(2x)	60	6
8)	Waschen mit CH_2Cl_2	(6x)	60	3
9)	Boc-As in CH_2Cl_2		25	10
10)	DCCI in CH_2Cl_2		1	120
11)	Waschen mit CH_2Cl_2	(3x)	60	3

die Kopplungsreaktion verwendet.

Nach beendeter Synthese führte man noch einen kompletten Abspaltungsschritt aus (Schritte 1 mit 8), dann wusch man das Polymer dreimal mit je 60 ml Essigsäure und sechsmal mit je 100 ml Äthanol und trocknete das Harz im Vacuum über Kaliumhydroxid.

Die Gewichtszunahme des Polymers nach beendeter Synthese betrug 976 mg. Dies entspricht einer Ausbeute der Kopplungsschritte von 99 %. Die Aminosäurezusammensetzung eines Totalhydrolysats von Harz-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂ betrug Glycin/Alanin = 1.0 : 3.93.

7.5. Abspaltung des Peptids vom Polymer (94,142)

Die Abspaltung des Peptids vom Polymer erfolgte mit Fluorwasserstoff in einer Teflon-Hochvacuumapparatur der Firma Peninsula/Toho, Tokyo. Abbildung 3, Seite 20, zeigt ein Schema der Apparatur.

Das Vorratsgefäß und die Kühlfalle kühlte man mit flüssigem Stickstoff und evakuierte dann die Apparatur. Nach Schließen sämtlicher Ventile ließ man langsam Fluorwasserstoff aus der Gasflasche in das Vorratsgefäß überdestillieren, das zum Trocknen des HF einige Gramm Kobalttrifluorid enthielt. Dann erwärmte man langsam das Vorratsgefäß unter magnetischem Rühren der $\text{CoF}_3/\text{HF}_{\text{fl.}}$ -Suspension auf Raumtemperatur und destillierte in das mit flüssigem Stickstoff gekühlte Reaktionsgefäß die benötigte Menge

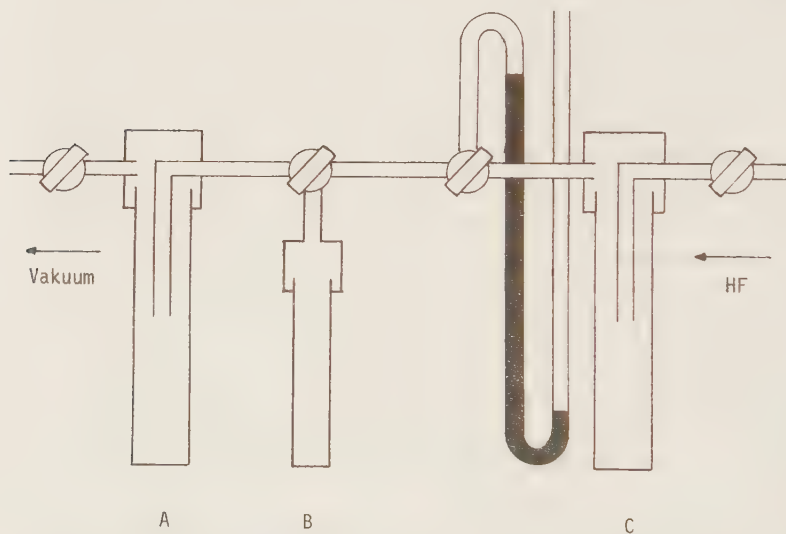


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Fluorwasserstoff-Hochvacuumanlage

Fluorwasserstoff über. Nach Schließen aller Ventile erwärmte man das Reaktionsgefäß auf 30 °C und rührte magnetisch. Nach beendeter Reaktion (20 Minuten) wurde der gesamte Fluorwasserstoff in die Kühlfalle überdestilliert und über die Wasserstrahlpumpe abgezogen.

Das Reaktionsgemisch löste man in 5 ml wasserfreiem Eisessig, filtrierte das Harz ab, wusch mit Eisessig nach, und präzipitierte das Peptid dann über Nacht mit Diisopropyläther. Das Präzipitat wurde mit Aceton gewaschen, in Aqua dest. gelöst, über Aktivkohle filtriert und lyophilisiert. Ausbeute: 87 %;

Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtelektrophorese sowie Chromatographie des vom Polymer abgespaltenen Peptids mit dem Aminosäureanalysator ergaben geringe Verunreinigungen durch Ninhydrin-positive Substanzen. Ihre Abtrennung gelang durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 (vgl. 21.4.1.).

Ausbeute nach der Chromatographie an Dowex 50: 77 %;

Papierchromatographie mit Glycin, Alanin, Gly-L-Ala und Di-L-Alanin als Referenzsubstanzen ergab die Einheitlichkeit des Peptids. $R_{\text{Ala}} = 1.59$ (T); $R_{\text{Ala}} = 1.17$ (U); $R_{\text{Ala}} = 1.18$ (V). Beim Sprühen des Peptids mit Ninhydrin erschien ein gelber Fleck, der sich erst allmählich violett färbte. Dies weist auf die N-terminale Position von Glycin hin.

Papierelektrophorese (Natriumformiatpuffer pH 1.5): 1 Fleck; $m_{\text{Ala}} = 0.78$; die Verbindung wanderte zur Kathode.

Chromatographie am Aminosäureanalysator: 1 Peak;

Aminosäurezusammensetzung: Alanin/Glycin = 4.01 : 1.0;

Elementaranalyse für $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_6$, MG = 359.38:

berechnet: C 46.79; H 7.01; N 19.49; O 26.71;

gefunden: C 46.65; H 7.19; N 19.33; O 26.83;

Razemisierung des Peptids während der Synthese konnte durch enzymatische Konfigurationsbestimmung ausgeschlossen werden. Die Aminosäurezusammensetzung eines mit D-Aminosäureoxydase inkubierten Totalhydrolysats des Peptids betrug Glycin/Alanin = 1.0 : 2.03.

8. Synthese der Protein-Peptid-Konjugate Protein-(CH₂CO-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)_n; Protein-(CH₂CO-Gly₅)_n; Protein-(CH₂CO-L-Ala₅)_n; (gekoppelte Peptidketten mit freien C-Termini)

Die Darstellung der synthetischen Protein-Peptid-Konjugate erfolgte analog der von Schechter et al. (109) beschriebenen Methode.

8.1. Jodacetylsuccinimidester

Jodacetylsuccinimidester wurde nach (109) aus Jodessigsäure und N-Hydroxysuccinimid hergestellt.

Ausbeute: 52 % (Lit. 54 %); Schmelzpunkt: 147 °C (Lit. 147 °C);

Elementaranalyse für C₆H₆JNO₄, MG = 283.02:

berechnet: C 25.46; H 2.14; J 44.84; N 4.95; O 22.61;

gefunden: C 25.90; H 2.05; J 44.65; N 4.81; O 22.59;

Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtelektrophorese mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylharnstoff als Referenzsubstanzen ergaben die Einheitlichkeit der Verbindung: R_f = 0.43 (A); R_f = 0.36 (E); R_f = 0.43 (C); m_{Asp} = 7.1 ("pH 6.4");

Der Nachweis der Substanzflecke durch ein Sprühreagenz nach Reindel-Hoppe und im UV ergab einen identischen Fleck.

8.2. JAc-Gly₅; JAc-L-Ala₅; JAc-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂

0.5 mM Peptid und 1 mM Natriumhydrogencarbonat in 12.5 ml Wasser versetzte man mit 0.5 mM Jodacetylsuccinimidester in 5 ml peroxidfreiem Dioxan. Nach zwölfstündiger Reaktion bei 4 °C wurde das Dioxan durch schnelles Eindampfen am Vacuumrotationsverdampfer entfernt und anschließend 5 ml Wasser und 1.25 mM HCl zugegeben. Das gelatineartige Reaktionsprodukt wurde in einer Schott-G-3-Fritte gesammelt, mit 0.02 N HCl und Aqua dest. gewaschen und anschließend lyophilisiert. Die analytischen Daten der jodacetylierten Peptide sind in Tabelle 4 (Seite 23) zusammengefaßt.

Tabelle 4. Analytische Daten der jodacetylierten Peptide JAc-L-Ala₅,
JAc-Gly₅ und JAc-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂

	JAc-L-Ala ₅	JAc-Gly ₅	JAc-Gly-Ala ₄
<u>Ausbeute</u>	47 %	66 %	59 %
<u>Elementar-</u> <u>analyse</u>	C ₁₇ H ₂₈ JN ₅ O ₇ ; 541.34 ber.: gef.: C 37.22 C 37.65 H 5.21 H 5.34 J 23.44 J 23.48 N 12.94 N 12.89 O 20.69 O 20.64	C ₁₂ H ₁₈ JN ₅ O ₇ ; 471.20 ber.: gef.: C 30.41 C 30.59 H 4.07 H 3.85 J 26.89 J 26.93 N 14.81 N 14.86 O 23.82 O 23.77	C ₁₆ H ₂₆ JN ₅ O ₇ ; 527.31 ber.: gef.: C 36.44 C 36.50 H 4.97 H 5.12 J 24.06 J 23.29 N 13.28 N 13.30 O 21.24 O 21.79
<u>DC-Chroma-</u> <u>tographie</u>	R _f = 0.27 (E) R _f = 0.22 (A) R _f = 0.37 (F)	R _f = 0.07 (E) R _f = 0.34 (A) R _f = 0.13 (F)	R _f = 0.22 (E) R _f = 0.24 (A) R _f = 0.34 (F)
<u>DC-Elek-</u> <u>trophore-</u> <u>se</u>	m _{Lys} = 0 (pH 6.4)	m _{Lys} = 0 (pH 6.4)	m _{Lys} = 0 (pH 6.4)

Der Nachweis der Substanzflecke in der Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtelektrophorese erfolgte nach Reindel-Hoppe (sekundäre Amino-
gruppen). Die Verbindungen waren UV-negativ. 5 µM der Jodacetylpeptide
ergaben keine positive Ninhydrinreaktion (Blockierung der α-Aminogruppe).

8.3. Kopplung der Peptide an die Trägerproteine

Eine Lösung von 250 mg Protein, 8 m Harnstoff und 0.1 m NaHCO₃ in 9 ml
Aqua dest. stellte man mit 1 N NaOH auf pH 10 ein und versetzte an-
schließend mit 0.30 mM jodacetyliertem Peptid. Nach dreitägiger Reaktion

bei 37 °C wurden die gebildeten Protein-Peptid-Konjugate gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Die Trägerproteine Humanserumalbumin, Ribonuclease und Hämocyanin, die in den Präzipitationsversuchen als Kontrollen eingesetzt wurden, behandelte man unter den oben angegebenen Bedingungen.

9. Synthese der Konjugate (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA und (L-Ala₃-ε-Acp)₁₁-RNase

(N-terminales Alanin)

Die Verwendung von N-Hydroxysuccinimidestern in der Peptidsynthese wurde von Anderson et al. (4) beschrieben. Die Carbobenzoxygruppe führten Bergmann und Zervas (10) und die o-Nitrophenylsulphenylgruppe Zervas et al. (173) als Schutzgruppe in die Peptidchemie ein. Die Kopplung der Peptide an die Trägerproteine erfolgte ähnlich wie in (108) beschrieben.

9.1. Z-L-Ala₂-OSu

Zu einer Lösung von 9.52 mM $\hat{=}$ 2.802 g Z-L-Ala₂ und 9.52 mM $\hat{=}$ 1.096 g N-Hydroxysuccinimid in 40 ml 1,2-Dimethoxyäthan wurde unter Kühlung 9.52 mM $\hat{=}$ 1.964 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Nach 18-stündiger Reaktion bei 4 °C wurde der gebildete Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und mit 1,2-Dimethoxyäthan gewaschen. Das Filtrat wurde im Vacuum bei 40 °C konzentriert, das ausgefallene Reaktionsprodukt mit Diäthyläther verrieben und zweimal aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 84 %; Schmelzpunkt: 136-138 °C; Elementaranalyse für C₁₈H₂₁N₃O₇
MG = 391.38:

berechnet: C 55.22; H 5.41; N 10.74; O 28.61;

gefunden: C 55.12; H 3.19; N 10.87; O 30.82;

Dünnschichtchromatographie mit Eddukt, N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylharnstoff als Referenzsubstanzen ergab die Einheitlichkeit der Verbindung. R_f = 0.81 (D); R_f = 0.93 (G); R_f = 0.91 (H);

Der Nachweis der Substanzflecke erfolgte nach Reindel-Hoppe (sekundäre Aminogruppen) und im UV. Die im UV und die nach Reindel-Hoppe identifizierten Flecke waren identisch. 10 μ M Z-L-Ala₂-OSu ergaben mit Ninhydrin keine positive Reaktion (Blockierung der α -Aminogruppe).

9.2. Z-L-Ala₂- ϵ -Acp

Eine Lösung von 5.62 mM Z-L-Ala₂-OSu in 17 ml Dioxan gab man zu einer Lösung von 5.62 mM ϵ -Aminocaprönsäure und 11.24 mM Natriumhydrogencarbonat in 17 ml Aqua dest.. Nach 18 Stunden Reaktionszeit bei 4 °C wurde die klare Lösung zur Entfernung von Dioxan im Vacuum bei 40 °C konzentriert. Nach Zugabe von 56 ml H₂O und Ansäuern der Lösung auf pH 2.0 mit 6 N HCl präzipitierte das N-geschützte Peptid. Nach vierstündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde der Niederschlag abzentrifugiert (48000 g, 10 Minuten), mit 0.01 N HCl gewaschen und im Vacuum über Kaliumhydroxid und Schwefelsäure getrocknet.

Ausbeute: 49 %; Elementaranalyse für C₂₀H₂₉N₃O₆; MG = 407.47:
berechnet: C 58.95; H 7.17; N 10.31; O 23.56;
gefunden: C 58.78; H 7.37; N 10.35; O 23.50;

Dünnschichtchromatographie mit Z-L-Ala₂-OSu und ϵ -Aminocaprönsäure als Referenzsubstanzen ergab die Einheitlichkeit der Verbindung. Der Nachweis der Substanzflecke erfolgte nach Reindel-Hoppe und im UV. Die durch unterschiedliche Nachweismethoden erhaltenen Flecke waren identisch. 10 μ M Z-L-Ala₂- ϵ -Acp ergaben mit Ninhydrin keine positive Reaktion.
 R_f = 0.49 (C); R_f = 0.40 (I);

Aminosäurezusammensetzung: Ala : ϵ -Acp = 2.05 : 1.0;

9.3. L-Ala₂- ϵ -Acp

2.45 mM Z-L-Ala₂- ϵ -Acp löste man in 30 ml Eisessig und hydrierte das Reaktionsgemisch nach Zugabe von 3 ml Aqua dest. und 1.5 g Palladium/Aktivkohle für 30 Stunden bei Raumtemperatur und atmosphärischem Druck. Die Beendigung der Reaktion überprüfte man dünnschichtelektrophoretisch.

Nach abgelaufener Reaktion spülte man das Hydriergefäß 10 Minuten mit Stickstoff, filtrierte den Katalysator ab und konzentrierte die Lösung im Vacuum auf wenige ml. Dann addierte man Wasser und engte erneut auf ein geringes Volumen ein. Nach Zugabe von Diäthyläther präzipitierte das Peptid. Man filtrierte auf einer Schott-G-3-Fritte ab, wusch mit absolutem Äthylalkohol und absolutem Diäthyläther und trocknete im Vacuum. Geringe Verunreinigungen durch andere Ninhydrin-positive Substanzen ließen sich durch Chromatographie an Dowex I (21.4.2.) abtrennen.

Ausbeute: 65 %; Elementaranalyse für $C_{12}H_{23}N_3O_4$; MG = 273.33:

berechnet: C 52.73; H 8.48; N 15.37; O 23.48;

gefunden: C 52.69; H 8.53; N 15.31; O 24.47;

Aminosäurezusammensetzung: Ala : ϵ -Acp = 2.08 : 1.0;

Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtelektrophorese ergaben die Einheitlichkeit der Verbindung. $R_f = 0.40$ (D); $R_f = 0.19$ (I); $m_{Ala} = 0.91$ ("pH 2.4");

Der Nachweis der Substanzflecke erfolgte nach Reindel-Hoppe und mit Ninhydrin; die identifizierten Flecke waren jeweils identisch.

Die Chromatographie mit dem Aminosäureanalysator ergab einen Peak.

9.4. NPS-L-Ala

- - - - -

3 mM NPS-L-Ala·DCHA löste man in 30 ml 0.1 M $NaHCO_3$ -Lösung, extrahierte die wässrige Phase zur Entfernung von NPS-chlorid mit Diäthyläther und stellte den pH dann mit 0.2 M H_2SO_4 auf 4.5 ein. Das freigesetzte NPS-Alanin extrahierte man mit Äthylacetat und wusch die organische Phase mehrmals mit Aqua dest., bis die wässrige Phase neutral gegen Kongorotpapier reagierte. Die Äthylacetatphase trocknete man über Natriumsulfat, filtrierte, und engte dann im Vacuum bei 40 °C zur Trockene ein. Das freigesetzte NPS-Alanin wurde sofort weiterverarbeitet.

Dünnschichtchromatographie zeigte die Einheitlichkeit der Verbindung. $R_f = 0.60$ (D); der Nachweis der Verbindung auf den DC-Platten erfolgte durch Eigenfärbung. Die Substanz zeigte keine positive Ninhydrinreaktion.

9.5. NPS-L-Ala-OSu

- - - - -

Zu einer Lösung von 2.73 mM NPS-L-Alanin und 2.73 mM N-Hydroxysuccinimid in 10 ml Dioxan gab man unter Kühlung 2.73 mM N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid. Nach 14-stündiger Reaktion bei 4 °C filtrierte man den gebildeten Dicyclohexylharnstoff ab, wusch mit Dioxan und konzentrierte das Filtrat im Vacuum bei 40 °C. Das gelbe Öl kristallisierte nach Zugabe von Diäthyläther aus. Der entstandene Succinimidester wurde viermal mit Diäthyläther gewaschen, filtriert, und aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 63 %; Schmelzpunkt: 155-156 °C; Elementaranalyse für

$C_{13}H_{13}N_3O_6S$; MG = 339.33:

berechnet: C 46.02; H 3.86; N 12.38; O 28.29; S 9.45;

gefunden: C 46.17; H 3.99; N 12.26; O 28.44; S 9.14;

Dünnschichtchromatographie mit NPS-L-Ala als Referenzsubstanz ergab einen Fleck. $R_f = 0.47$ (E); Der Nachweis der Verbindung erfolgte durch Eigenfärbung, nach Reindel-Hoppe, im UV und mit Ninhydrin nach Abspalten der Schutzgruppe. Das N-geschützte Alanin zeigte mit Ninhydrin keine positive Reaktion.

9.6. NPS-L-Ala₃-ε-Acp

- - - - -

Eine Lösung von 1.61 mM NPS-Alaninsuccinimidester in 5 ml Dioxan gab man zu einer Lösung von 1.61 mM L-Ala₂-ε-Acp und 3.22 mM NaHCO₃ in 5 ml Aqua dest.. Nach 18 Stunden Reaktionszeit wurde die Lösung filtriert und zur Entfernung von Dioxan im Vacuum bei 40 °C eingeeengt. Nach Zugabe von 16 ml Aqua dest. und Ansäuern der Lösung mit 6 N HCl auf pH 2 präzipitierte das N-geschützte Peptid. Man zentrifugierte den Niederschlag ab (48000 g, 10 Minuten), wusch mit 0.01 N HCl und trocknete das entstandene Gel im Vacuum. Die Umkristallisation erfolgte aus Methanol/Petroläther.

Ausbeute: 78 %; Elementaranalyse für $C_{21}H_{31}N_5O_7S$; MG = 497.57:

berechnet: C 50.69; H 6.28; N 14.07; O 22.51; S 6.44;

gefunden: C 50.64; H 6.42; N 13.95; O 22.62; S 6.37;

Dünnschichtchromatographie mit NPS-L-Ala-OSu und L-Ala₂- ϵ -Acp als Referenzsubstanzen ergab die Einheitlichkeit der Verbindung. $R_f = 0.48$ (D); Der Nachweis der Substanzflecke erfolgte durch die Eigenfärbung der NPS-Schutzgruppe, im UV, mit dem Reindel-Hoppe-Reagenz und mit Ninhydrin nach Abspalten der Schutzgruppe. Die durch die verschiedenen Nachweismethoden erhaltenen Flecke waren identisch. Das NPS-Peptid zeigte keine positive Ninhydrinreaktion.

9.7. NPS-L-Ala₃- ϵ -Acp-OSu

1 mM NPS-L-Ala₃- ϵ -Acp löste man in 150 ml DMF (sehr schlechte Löslichkeit) und gab unter Kühlen 1 mM N-Hydroxysuccinimid und 1 mM N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, in 10 ml DMF gelöst, zu. Die Lösung wurde bei 4 °C für 24 Stunden heftig gerührt. Nach beendeter Reaktion filtrierte man den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und wusch mit DMF. Das Filtrat engte man im Vacuum bei 40 °C auf ungefähr 80 ml ein und präzipitierte den aktiven Ester dann durch Zugabe von Diäthyläther. Das ausgefallene dicke Gel wurde mit Diäthyläther gewaschen, im Vacuum getrocknet und ohne weitere Reinigung verwendet.

Ausbeute: ca 58 %; (Bestimmung der Ausbeute durch Wägung des leeren und des mit dem Reaktionsprodukt gefüllten Reaktionsgefäßes).

9.8. (NPS-L-Ala₃- ϵ -Acp)₁₁-RNase und (NPS-L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA

Eine Lösung von 0.018 mM $\hat{=}$ 250 mg RNase und 0.685 mM NaHCO₃ in 10 ml Aqua dest. gab man unter Kühlung auf 4 °C zu einer Lösung von 0.275 mM NPS-L-Ala₃- ϵ -Acp-OSu in 10 ml DMF. Nach 18 Stunden Reaktionszeit bei 4 °C dialysierte man das Reaktionsgemisch gegen 0.05 m NaHCO₃, gegen Aqua dest. und Aqua bidest., und lyophilisierte dann das Konjugat.

Zur Darstellung von (NPS-L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA setzte man 0.725 μ M $\hat{=}$ 50 mg HSA und 0.112 mM NaHCO₃ in 2 ml Aqua dest. mit 0.045 mM NPS-L-Ala₃- ϵ -Acp-OSu in 2 ml DMF um und arbeitete dann wie oben beschrieben weiter auf.

(NPS-L-Ala₃-ε-Acp)₁₁-RNase

Ausbeute: 95 % (bezogen auf das
eingesetzte Pro-
tein)

72 % bezogen auf das
eingesetzte NPS-
L-Ala₃-ε-Acp-OSu

Substitution: ca. 11 Mol NPS-
Peptid/Mol RNase

(NPS-L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA

Ausbeute: 97 % (bezogen auf das
eingesetzte Pro-
tein)

35 % bezogen auf das
eingesetzte NPS-
L-Ala₃-ε-Acp-OSu

Substitution: ca. 22 Mol NPS-
Peptid/Mol HSA

Die Substitution der Proteine mit NPS-L-Ala₃-ε-Acp- bestimmte man durch Vergleich der quantitativen Aminosäurezusammensetzung von Totalhydrolysaten der Trägerproteine und der NPS-Peptidyl-Proteine.

9.9. (L-Ala₃-ε-Acp)₁₁-RNase und (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA
- - - - -

Zur Ablösung der NPS-Schutzgruppe löste man 50 mg Peptidyl-Protein in einer Lösung von 100 mg Carbobenzoxy-L-Tryptophan in 3 ml Eisessig und versetzte mit 0.5 ml 2 N HCl in Dioxan. Nach einstündiger Reaktion bei Raumtemperatur präzipitierte man das Peptidyl-Protein durch Zugabe von absolutem Äther, filtrierte auf einer Schott-G-3-Fritte ab, wusch mit absolutem Äthanol und absolutem Diäthyläther nach und trocknete im Vacuum.

Die weitere Reinigung der Konjugate erfolgte durch Gelchromatographie an Sephadex G-25 (vgl. 21.5.1.).

(HCl·L-Ala₃-ε-Acp)₁₁-RNase

Ausbeute: 85 % nach Abspalten der
NPS-Schutzgruppe;

80 % nach Gelchromatogra-
phie an Sephadex G-25

(HCl·L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA

Ausbeute: 95 % nach Abspalten
der NPS-Schutz-
gruppe;

85 % nach Gelchroma-
tographie an Se-
phadex G-25

10. Synthese der Konjugate $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$ und $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{10}\text{-RNase}$

(N-terminales Glycin)

Die Synthese dieser Konjugate erfolgte ähnlich der in 9. beschriebenen Methode. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die analytischen Daten der Synthesezwischenprodukte sowie die der Konjugate.

Tabelle 5. Synthese von $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$ und $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{10}\text{-RNase}$. Analytische Daten der Synthesezwischenprodukte und der Konjugate

<u>Verbindung</u>	<u>Aus- beute</u>	<u>DC-Chromato- graphie *)</u>	<u>Aminosäure- verhältnis</u>	<u>Solvens während der Synthese</u>	<u>vgl.</u>
<u>Z-Gly₄</u>	57 %	R _f =0.72 (E) R _f =0.84 (K) R-H;UV;Nh ⁻ ;		Dioxan H ₂ O	9.2.
<u>Z-Gly₄-OSu</u>	42 %	R _f =0.95 (G) R-H;UV;Nh ⁻ ;		DMF	9.1.
<u>Z-Gly₄-ε-Acp</u>	56 %	R _f =0.47 (C) R-H;UV;Nh ⁻ ;	Gly/ε-Acp = 4.07 : 1.0	Dioxan H ₂ O	9.2.
<u>Gly₄-ε-Acp</u> (+)	86 %	R _f =0.46 (D) R _f =0.24 (I) R-H;Nh;J ₂ ;	Gly/ε-Acp = 4.04 : 1.0	Eisessig H ₂ O	9.3.
<u>NPS-Gly</u>		R _f =0.50 (D) Eig.-färb.			9.4.
<u>NPS-Gly-OSu</u>	65 %	R _f =0.43 (E) Eig.-färb.			9.5.

<u>Verbindung</u>	<u>Aus- beute</u>	<u>DC-Chromato- graphie *)</u>	<u>Aminosäure- verhältnis</u>	<u>Solvens während der Synthese</u>	<u>vgl.</u>
<u>NPS-Gly₅- ε-Acp</u>	75 %	R _f =0.53 (E) Eig.-färb. R-H;UV;Nh ⁻ ; HCl/Nh;	Gly/ε-Acp = 5.06 : 1.0	Dioxan H ₂ O	9.6.
<u>NPS-Gly₅- ε-Acp-OSu</u>	67 %			DMF	9.7.

*) Der Nachweis der Substanzflecke erfolgte nach Reindel-Hoppe (R-H), im UV, mit Ninhydrin (Nh), durch Eigenfärbung (Eig.-färb.), mit Jod-
dampf (J₂) oder mit Ninhydrin nach Abspalten der Schutzgruppe mit
HCl (HCl/Nh). Verbindungen mit geschützter ε-Aminogruppe zeigten
keine positive Ninhydrin-Reaktion (Nh⁻).

+) Die Abtrennung geringer Verunreinigungen durch Ninhydrin-positive
Substanzen erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex I
(21.4.2.)

<u>Konjugat</u>	<u>Ausbeute</u>	<u>Substitution</u>	<u>vgl.</u>
<u>(NPS-Gly₅-ε-Acp)₁₀-RNase</u>	99 % bezogen auf das eingesetzte Pro- tein 70 % bezogen auf NPS- Gly ₅ -ε-Acp-OSu	ca. 10 Mol NPS-Peptid/ Mol RNase	9.8.

<u>Konjugat</u>	<u>Ausbeute</u>	<u>Substitution</u>	<u>vgl.</u>
<u>(NPS-Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA</u>	97 % bezogen auf das eingesetzte Protein 32 % bezogen auf NPS- Gly ₅ -ε-Acp-OSu	ca. 20 Mol NPS-Peptid/ Mol HSA	9.8.
<u>(Gly₅-ε-Acp)₁₀-RNase</u>	87 % nach Abspalten der NPS-Schutz- gruppe 82 % nach Gelchroma- tographie an Sephadex G-25	ca. 10 Mol Peptid/Mol RNase	9.9.
<u>(Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA</u>	93 % nach Abspalten der NPS-Schutz- gruppe 88 % nach Gelchroma- tographie an Sephadex G-25	ca. 20 Mol Peptid/Mol HSA	9.9.

Die Substitution der Proteine mit NPS-Gly₅-ε-Acp- bzw. mit Gly₅-ε-Acp- bestimmte man durch Vergleich der quantitativen Aminosäurezusammensetzung von Totalhydrolysaten der Trägerproteine, der NPS-Peptidyl-Proteine sowie der Peptidyl-Proteine.

11. Synthese des Konjugats (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase; (N-terminales Alanin)

Die Darstellung dieses Konjugats erfolgte durch Synthese von NPS-L-Ala-Gly₄ aus NPS-L-Ala-OSu und Tetraglycin, Succinimidveresterung der freien

Carboxylgruppe von NPS-L-Ala-Gly₄ und Kopplung des aktivierten NPS-Peptids an RNase, analog wie in 9.6. bis 9.8. beschrieben. Die Abspaltung der NPS-Schutzgruppe findet sich ausführlich in 9.9. dargestellt. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die analytischen Daten der Synthese-Zwischenprodukte sowie die des Konjugats.

Tabelle 6. Synthese von (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase. Analytische Daten der Synthese-Zwischenprodukte und des Konjugats

<u>Verbindung</u>	<u>Ausbeute</u>	<u>DC-Chromatographie *)</u>	<u>Aminosäureverhältnis</u>	<u>Solvens während der Synthese</u>	<u>vgl.</u>
<u>NPS-L-Ala-Gly₄</u>	76 %	R _f =0.52 (D) Eig.-färb.; R-H;UV;Nh ⁻ ;	Gly/Ala = 4.06 : 1.0	Dioxan H ₂ O	9.6.
<u>NPS-L-Ala-Gly₄-OSu</u>	64 %			DMF	9.7.
=====					
<u>Konjugat</u>	<u>Ausbeute</u>		<u>Substitution</u>		<u>vgl.</u>
<u>(NPS-L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase</u>	98 % bezogen auf das eingesetzte Protein 71 % bezogen auf NPS-L-Ala-Gly ₄ -OSu		ca. 11 Mol NPS-Peptid/ Mol RNase		9.8.
<u>(L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase</u>	85 % nach Abspalten der Schutzgruppe 80 % nach Chromatographie an Sephadex G-25		ca. 11 Mol Peptid/Mol RNase		9.9.

*) Der Nachweis der Substanzflecke erfolgte durch Eigenfärbung (Eig.-färb.), nach Reindel-Hoppe (R-H) und im UV. Die Verbindung zeigte keine positive Ninhydrin-Reaktion (Nh^-).

Die Substitution von RNase mit NPS-L-Ala-Gly₄- bzw. mit L-Ala-Gly₄- bestimmte man durch Vergleich der quantitativen Aminosäurezusammensetzung von Totalhydrolysaten von RNase, NPS-Peptidyl-RNase sowie von Peptidyl-RNase.

12. Darstellung von Sepharose-4B-(Gly₅)_n; (C-terminales Glycin); (14)

20 ml Sepharose wurden viermal mit Aqua dest. gewaschen und nach Abdekantieren des Überstands in 20 ml destilliertem Wasser suspendiert. Zu dieser Suspension gab man unter starkem Rühren auf einmal 900 mg Bromcyan, in 16 ml Aqua dest. gelöst, zu. Der pH des Reaktionsgemisches wurde durch Addition von 2 M NaOH konstant bei 11.0 gehalten. Die Suspension rührte man bis zur Beendigung der Reaktion (ca. 10 Minuten, danach keine Freisetzung von Protonen mehr) bei Raumtemperatur. Die Temperatur hielt man durch Zugabe von Eis konstant. Dann fügte man rasch große Mengen Eis hinzu, überführte die Suspension schnell in einen Büchner-Trichter und wusch unter Absaugen mit 125 ml eiskalter 0.1 m NaHCO_3 -Lösung. Die gewaschene Sepharose rührte man rasch in eine eiskalte Lösung von 330 mg Pentaglycin in 17 ml 0.1 m NaHCO_3 , und hielt die Suspension unter leichtem Rühren für 20 Stunden bei 4 °C. Anschließend wusch man die Sepharose mit Wasser, 0.1 m NaHCO_3 , 0.2 m Acetat-Puffer pH 4.5, 0.2 m Phosphatpuffer pH 7.2 und 0.01 m PBS pH 7.3.

13. Acetylierung und Formylierung von Aminosäuren und Peptiden

13.1. Acetyl-D-Alanin

1 mM D-Alanin und 1 ml Acetanhydrid wurden bei 0 °C vorsichtig mit 2 N NaOH bis zur alkalischen Reaktion versetzt und die Lösung dann 3 Stun-

den bei 0 °C unter Rühren inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde auf einer feinen Fritte abfiltriert, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und das acetylierte Alanin aus Aceton umkristallisiert und bei 100 °C getrocknet.

Ausbeute: 83 %; Schmelzpunkt: 125 °C (Lit. 125 °C); Elementaranalyse für $C_5H_9NO_3$, MG = 131.13:

berechnet: C 45.80; H 6.92; N 10.68; O 36.60;

gefunden: C 45.76; H 7.02; N 10.62; O 36.60;

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +66.5^\circ$ (c = 2 in H_2O);

13.2. Acetyl-Triglycin und Acetyl-Pentaglycin

1 mM Triglycin bzw. Pentaglycin löste man in 15 ml Aqua dest. und 10 ml Pyridin, kühlte auf 4 °C und gab 2 ml Acetanhydrid zu. Nach vier Stunden Reaktionszeit engte man das Produkt am Vacuumrotationsverdampfer zur Trockene ein. Zum Vertreiben des Pyridins nahm man mehrmals in wenig Wasser auf und engte dann erneut zur Trockene ein. Die acetylierten Peptide löste man in wenig Aqua dest. und fällte mit Aceton.

Tabelle 7. Analytische Daten von Acetyl-Triglycin und Acetyl-Pentaglycin

	Ac-Gly ₃	Ac-Gly ₅
<u>Ausbeute</u>	77 %	74 %
<u>Elementar-</u> <u>analyse</u>	$C_8H_{13}N_3O_5$; 231.21 berechnet: gefunden: C 41.56; C 41.48; H 5.67; H 5.83; N 18.17; N 18.00; O 34.60; O 34.69;	$C_{12}H_{19}N_5O_7$; 345.31 berechnet: gefunden: C 41.74; C 41.68; H 5.55; H 5.42; N 20.28; N 20.41; O 32.43; O 32.49;

	Ac-Gly ₃	Ac-Gly ₅
<u>Dünnschichtchromatographie</u>	R _f = 0.40 (E) 1 Fleck R _f = 0.30 (K)	R _f = 0.06 (E) 1 Fleck R _f = 0.25 (K)
<u>Dünnschichtelektrophorese</u>	"pH 2.4" keine Beweglichkeit	"pH 2.4" keine Beweglichkeit
<u>Chromatographie mit dem Aminosäureanalyzer</u>	10 µM Acetyl-Triglycin bzw. Acetyl-Pentaglycin zeigten keine Verunreinigung durch freies Triglycin bzw. Pentaglycin.	

13.3. Ac₂-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂, Ac₂-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala,

Ac₂-Gly-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂

Die Acetylierung der Peptide L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂, L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala und Gly-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂ erfolgte wie in (117) beschrieben.

13.4. N-Formyl-L-Ala-D-Ala und N-Formyl-L-Ala-D-Ala-Gly (136)

Zu 1 mM L-Ala-D-Ala bzw. 1 mM L-Ala-D-Ala-Gly in 2.1 ml 98 %-iger Ameisensäure tropfte man langsam 0.7 ml Acetanhydrid zu. Die Temperatur des Reaktionsansatzes hielt man durch Eiskühlung zwischen 5 bis 10 °C. Das Reaktionsgemisch rührte man eine Stunde, addierte 0.8 ml Eiswasser und engte die Lösung dann am Vacuumrotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockene ein. Die Umkristallisation erfolgte aus Wasser.

Ausbeute: 85 % für For-L-Ala-D-Ala; 89 % für For-L-Ala-D-Ala-Gly; 5 µM der formylierten Peptide gaben keine positive Ninhydrinreaktion (Blockierung der Aminogruppe).

14. Methylveresterung von Aminosäuren und Peptiden

14.1. D-Alaninmethylester

In eine Lösung von 2 mM D-Alanin und 30 ml absolutem Methanol wurde für vier Minuten ein Strom von trockenem Chlorwasserstoff-Gas eingeleitet und das Reaktionsgemisch anschließend vier Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel zog man dann mit dem Vacuumrotationsverdampfer ab, das entstandene Alaninmethylester-Hydrochlorid blieb als dicker, gelb gefärbter Sirup zurück. Zum Vertreiben des Chlorwasserstoffs löste man das Produkt mehrere Male in absolutem Methanol auf und engte erneut zur Trockene ein. Der Ester wurde dann in 6 ml absolutem Methanol gelöst und mit Di-isopropyläther gefällt.

Ausbeute: 56 %; Schmelzpunkt: 109-111 °C; Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -6.5$ (c = 2 in Methanol);

14.2. Triglycin-methylester und Pentaglycin-methylester

In einem Dreihalskolben mit Rückflußkühler/Calciumchloridrohr und Gas-einleitungsrohr suspendierte man 1 mM Triglycin bzw. Pentaglycin in 50 ml absolutem Methanol und perlte durch die Suspension unter Rühren getrockneten Chlorwasserstoff. Nach Einleiten von Chlorwasserstoff in die Suspension entstand eine klare Lösung. Nach 24 Stunden wurde das Reaktionsgemisch zur Trockene einrotiert und die Veresterung für zweimal 24 Stunden mit jeweils frischem Methanol wiederholt. Nach beendeter Reaktion engte man die Lösung im Vacuum bei 40 °C zur Trockene ein, löste zum Vertreiben des Chlorwasserstoffs mehrmals in absolutem Methanol auf, und zog das Lösungsmittel erneut im Vacuum ab. Dann löste man die Ester in 4 ml absolutem Methanol und fällte mit Di-isopropyläther.

Verunreinigungen der Ester durch das Eddukt (freies Triglycin bzw. Pentaglycin) ließen sich durch Chromatographie an Dowex I, Cl⁻-form, abtrennen. Die Peptidester wurden in 10 ml Wasser gelöst und 10 ml Ionenaustauscher zugegeben. Die Suspension rührte man 20 Minuten, filtrierte ab, und wiederholte die Behandlung mit Ionenaustauscher. Dann wurde die Lösung am Vacuumrotationsverdampfer zur Trockene eingengt, die Ester in 4 ml Methanol aufgenommen und mit Di-isopropyläther gefällt.

Tabelle 8. Analytische Daten von Triglycin-methylester und von Pentaglycin-methylester

	Gly ₃ -OMe	Gly ₅ -OMe
<u>Ausbeute:</u>	53 %	49 %
<u>Elementar-analyse</u>	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₄ ; 203.20 berechnet: gefunden: C 41.38; C 41.47; H 6.45; H 6.43; N 20.68; N 20.69; O 31.49 O 31.41;	C ₁₁ H ₁₉ N ₅ O ₆ ; 317.30 berechnet: gefunden: C 41.64; C 41.59; H 6.04; H 6.11; N 22.07; N 22.01; O 30.25; O 30.29;
<u>Dünnschichtchromatographie</u>	R _f = 0.13 (E) 1 Fleck	R _f = 0.12 (E) 1 Fleck
<u>Dünnschichtelektrophorese</u>	"pH 2.4": m _{Lys} = 0.16; 1 Fleck	"pH 2.4": m _{Lys} = 0.18; 1 Fleck
<u>Chromatographie mit dem Aminosäureanalysator</u> von Gly ₃ -OMe und Gly ₅ -OMe zeigte die Abwesenheit des Eddukts (Triglycin bzw. Pentaglycin).		

Zu 14.1. und 14.2.: Zur Darstellung von Chlorwasserstoff versetzte man in einem Kipp'schen Apparat Natriumchlorid tropfenweise mit konzentrierter Schwefelsäure und leitete den Chlorwasserstoff zur Trocknung durch eine mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllte Waschflasche.

15. L-Ala₃-ε-Acp, Gly₅-ε-Acp und L-Ala-Gly₄

50 µM der entsprechenden NPS-Peptide (9.6.; 10.; 11.) löste man unter

Erwärmen in wasserfreiem Äthylacetat/Aceton (1:1; v/v) und gab Chlorwasserstoff in wasserfreiem Äther zu. Das Peptidhydrochlorid präzipitierte sofort aus. Das Reaktionsgemisch wurde 10 Minuten geschüttelt und dann am Vacuumrotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockene eingengt. Überschüssigen Chlorwasserstoff entfernte man durch wiederholtes Aufnehmen in Äthylacetat und erneutes Konzentrieren im Vacuum zur Trockene.

Tabelle 9. Analytische Daten von L-Ala₃- ϵ -Acp, Gly₅- ϵ -Acp und L-Ala-Gly₄

	L-Ala ₃ - ϵ -Acp	Gly ₅ - ϵ -Acp	L-Ala-Gly ₄
<u>Aminosäure-</u> <u>zusammen-</u> <u>setzung</u>	Ala : ϵ -Acp = 3.03 : 1.0	Gly : ϵ -Acp = 5.06 : 1.0	Gly : Ala = 3.96 : 1.0
<u>Elementar-</u> <u>analyse</u>	C ₁₅ H ₂₈ N ₄ O ₅ ; 344.4	C ₁₆ H ₂₈ N ₆ O ₇ ; 416.4	C ₁₁ H ₁₉ N ₅ O ₆ ; 317.3
N berechnet	16.27	20.18	22.07 *)
N gefunden	16.31	20.04	20.18
<u>DC-Chromato-</u> <u>graphie</u>	R _f = 0.37 (D) R _f = 0.22 (I)	R _f = 0.42 (D) R _f = 0.27 (I)	R _f = 0.18 (K) R _f = 0.12 (L) R _f = 0.13 (M)
	1 Fleck mit Joddampf, Ninhydrin und dem Sprühreagenz nach Reindel-Hoppe;		

*) Die Elementaranalyse erbrachte den Hinweis, daß das Peptid ca. 5 % Wasser enthielt. Eine Trocknung bei erhöhten Temperaturen erfolgte jedoch nicht.

Dann nahm man den Rückstand in Äthylacetat auf und extrahierte mehrere Male mit Wasser. Die vereinigten wässrigen Phasen extrahierte man mit wenig Äthylacetat, dann mit Diäthyläther und filtrierte die Lösung schließlich durch Amberlite IR 4B (OH⁻-form) (21.4.3.). Das Säuleneluat engte man im Vacuum bei 40 °C zur Trockene ein, addierte wasserfreies Äthanol, und filtrierte das Produkt.

16. L-Ala-L-Ala-Gly, L-Ala-D-Ala-Gly, L-Ala-Gly-L-Ala und Gly-L-Ala-Gly

Tabelle 10. Analytische Daten von L-Ala₂-Gly, L-Ala-D-Ala-Gly, L-Ala-Gly-L-Ala und Gly-L-Ala-Gly

	L-Ala ₂ -Gly	L-Ala-D-Ala-Gly	Ala-Gly-Ala	Gly-Ala-Gly
<u>Aminosäure-</u> <u>zusammen-</u> <u>setzung</u>	Ala : Gly = 2.07 : 1.0	Ala : Gly = 2.05 : 1.0	Ala : Gly = 2.09 : 1.0	Gly : Ala = 2.09 : 1.0
<u>Elementar-</u> <u>analyse</u>	C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₄ ; (217.2)	C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₄ ; (217.2)	C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₄ ; (217.2)	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₄ ; (203.13)
N berechnet	19.34	19.34	19.34	20.69
N gefunden	19.28	19.32	19.30	20.57
<u>DC-Chroma-</u> <u>tographie</u>	R _f =0.09 (K) R _f =0.05 (L) R _f =0.05 (M)	R _f =0.09 (K) R _f =0.05 (L) R _f =0.05 (M)	R _f =0.11 (K) R _f =0.06 (L) R _f =0.06 (M)	R _f =0.11 (K) R _f =0.07 (L) R _f =0.08 (M)
1 Fleck mit Joddampf, Ninhydrin und dem Sprühreagenz nach Reindel-Hoppe;				

Die Darstellung dieser Verbindungen erfolgte durch Umsetzung von L-Ala-Gly, D-Ala-Gly und Gly-L-Ala mit NPS-L-Ala-OSu bzw. von L-Ala-Gly mit

NPS-Gly-OSu, ähnlich wie unter 9.6. beschrieben. Die NPS-Schutzgruppe wurde nach der in 15. angegebenen Methode abgespalten.

17. Synthese des Peptids D-Ala-D-Ala-Gly

17.1. Boc-D-Ala-OSu

Zu einer Lösung von 1 mM Boc-D-Ala und 1 mM Hydroxysuccinimid in 8 ml Dioxan gab man unter Kühlung 1 mM Dicyclohexylcarbodiimid zu. Nach 18-stündiger Reaktion bei 4 °C wurde der gebildete Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und mit Dioxan gewaschen. Das Filtrat konzentrierte man im Vacuum bei 40 °C, vertrieb das ausgefallene Produkt mit Diäthyläther und kristallisierte aus Isopropanol um.

17.2. Boc-D-Ala-D-Ala-Gly

Eine Lösung von 0.75 mM Boc-D-Ala-OSu in 5 ml Dioxan gab man zu einer Lösung von 0.75 mM D-Ala-Gly und 1.5 mM Natriumhydrogencarbonat in 5 ml Aqua dest.. Nach 18 Stunden Reaktionszeit bei 4 °C wurde die klare Lösung zur Entfernung von Dioxan im Vacuum bei 40 °C konzentriert. Nach Zugabe von 8 ml Wasser und Ansäuern der Lösung auf pH 2.0 mit 6 N HCl präzipitierte das N-geschützte Peptid. Nach vierstündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde der Niederschlag abzentrifugiert (48000 g, 10 Minuten), mit 0.01 N HCl gewaschen und im Vacuum über KOH und H₂SO₄ getrocknet.

17.3. D-Ala-D-Ala-Gly

0.56 mM Boc-D-Ala-D-Ala-Gly löste man in 10 ml Dioxan/TFA = 1 : 1 und rührte die Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dann konzentrierte man das Reaktionsgemisch im Vacuum bei 40 °C, nahm in 10 ml wasserfreiem Diäthyläther auf und filtrierte das Produkt auf einer Schott-G-3-Fritte. Das Peptid löste man in Aqua dest. (10 ml), extrahierte mit Diäthyläther und Äthylacetat, engte die wässrige Phase im Vacuum bei 40°C

zur Trockene ein und trocknete im Vacuum über KOH. Die Umkristallisation erfolgte aus Methanol/Diäthyläther.

Aminosäurezusammensetzung: Ala : Gly = 1.98 : 1.0; Elementaranalyse: N berechnet 19.34; N gefunden 19.35; Dünnschichtchromatographie: $R_f = 0.10$ (K); $R_f = 0.04$ (L); $R_f = 0.04$ (M);

18. Mono- und Oligosaccharide und deren Derivate

Die Herkunft der verwendeten Verbindungen wird nachfolgend angegeben.

Sigma:

N-Acetyl-D-Galactosamin	D-Glucose	D-Glucosamin
N-Acetyl-D-Glucosamin	α -Methyl-D-glucosid	D-Muraminsäure
N-Acetyl-D-Mannosamin	β -Methyl-D-glucosid	
N-Acetyl-D-Muraminsäure		

eigene Isolierung oder Synthese:

N-Acetyl-D-Muraminsäure-äthylamid

N-Acetyl-Chitobiose (GlcNAc- β -1,4-GlcNAc)

N-Acetyl-Chitotetraose (GlcNAc- β -1,4-GlcNAc- β -1,4-GlcNAc- β -1,4-GlcNAc)
GlcNAc- β -1,4-MurNAc

GlcNAc- β -1,4-MurNAc- β -1,4-GlcNAc- β -1,4-MurNAc

18.1. N-Acetyl-D-Muraminsäure-äthylamid

Zu 10 mg N-Acetyl-D-Muraminsäure in einem kleinen dickwandigen Reagenzglas addierte man 10 μ l Thionylchlorid, verschloß mit einer Glasperle und erwärmte 30 Minuten auf 80 °C. Dann entfernte man überschüssiges Reagenz durch Eindampfen im Vacuum, addierte tropfenweise eine 70 %-ige Lösung von Äthylamin in Wasser und kristallisierte den abgeschiedenen Niederschlag aus heißem Wasser um. Freie N-Acetyl-Muraminsäure trennte man durch präparative Papierchromatographie auf Whatman 3 MM Papier in

Pyridin/Pentanol-(2)/Wasser = 1:1:1 als Laufmittel ab.

18.2. Acetyl-Chitobiose und Acetyl-Chitotetraose

Chitin (Roth, Karlsruhe) extrahierte man wie unter 5. angegeben, suspendierte dann 20 g des hochgereinigten Chitins in 350 ml konzentrierter Salzsäure und inkubierte zwei Stunden bei 4 °C und drei Stunden bei 40 °C. Nach Abkühlen der Lösung neutralisierte man unter Eiskühlung mit 50 %-iger NaOH, filtrierte und engte die Lösung am Vacuumrotationsverdampfer bei 45 °C auf ein Volumen von etwa 250 ml ein. Zur Entsalzung adsorbierte man die Chitooligosaccharide dann an einer wässrigen Aufschlämmung von Aktivkohle/Celite (150 g/150 g), wusch gründlich mit Wasser nach und desorbierte die Oligosaccharide wieder mit 70 % Äthanol. Das Partialhydrolysat chromatographierte man an Sephadex G-15 (2.5 x 100 cm Säulenabmessung) mit Wasser als Elutionsmittel und einer Elutionsgeschwindigkeit von 40 ml/h und isolierte die N-Acetyl-Chitobiose und die N-Acetyl-Chitotetraose dann durch präparative DC-Chromatographie auf Celluloseplatten.

18.3. GlcNAc- β -1,4-MurNAc und GlcNAc- β -1,4-MurNAc- β -1,4-GlcNAc- β -1,4-

MurNAc (140)

18.3.1. Isolierung von tryptisch gereinigter Zellwand von Mc. luteus

Micrococcus luteus wurde in Massenkulturen (36 l) gezüchtet, die Zellen in der spätlogarithmischen Phase geerntet und tryptisch gereinigte Zellwand wie in 4.1. beschrieben isoliert.

18.3.2. Hydrolyse der Zellwände mit Lysozym

Jeweils 2.24 g lyophilisierte ZW-tryp von Mc. luteus suspendierte man in 100 ml 0.05 m Ammoniumacetatlösung, gab 5 mg Lysozym und einige Tropfen Toluol zu, und inkubierte für 12 Stunden bei 37 °C.

18.3.3. Dialyse der Zellwandhydrolysate von 18.3.2.

Das Hydrolysat von 18.3.2. füllte man in einen Dialyseschlauch (Visking, molekulare Ausschußgrenze 10000 MG). Die Dialyse führte man in einem Glasrohr mit Zu- und Ablauf (Länge 70 cm, innerer Durchmesser 25 mm) aus. 600 ml Toluol-gesättigtes Wasser leitete man innerhalb von 12 Stunden durch das Dialyserohr. Das Dialysat konzentrierte man im Vacuum bei 40 °C und lyophilisierte dann.

18.3.4. Chromatographie des Dialysats an Amberlite CG 120

Zur Abtrennung von basischem und teilweise auch von neutralem Material aus dem Dialysat von 18.3.3. chromatographierte man an Amberlite CG 120, wie in 21.4.4. ausführlich beschrieben.

18.3.5. Gelchromatographie des Eluats von 18.3.4. an Sephadex G-15

Die Abtrennung von GlcNAc- β -1,4-MurNAc und von GlcNAc- β -1,4-MurNAc- β -1,4-GlcNAc- β -1,4-MurNAc aus dem Eluat von 18.3.4. erfolgte durch Gel-filtration an Sephadex G-15 (vgl. 21.5.3.).

19. Hydrolyse

Tabelle 11, Seite 45, gibt eine Übersicht über die gewählten Hydrolysebedingungen.

Die Hydrolysen im "Einschlußrohr" wurden im zugeschmolzenen Rohr bei 100 °C im Thermostaten durchgeführt. Nach beendeter Hydrolyse wurden die Röhrchen am zugeschmolzenen Ende aufgebrochen und die Hydrolysate rasch mit Hilfe eines gereinigten Luftstroms unter Erwärmen im Wasserbad auf 40 °C abgeblasen.

Die Hydrolysen unter "Rückfluß" filtrierte man nach beendeter Hydrolyse und engte das Hydrolysat dann am Vacuumrotationsverdampfer zur Trockene ein.

Tabelle 11. Hydrolysebedingungen

<u>Freie Peptide</u>	6 N HCl, 100°C	Einschluß- rohr	16 h	1 ml HCl/mg Peptid
<u>Proteine, Peptidyl-Proteine</u>	6 N HCl, 100°C	Einschluß- rohr	48 h	1 ml HCl/mg Protein
<u>Zellwände</u>	4 N HCl, 100°C	Einschluß- rohr	16 h	0.1 ml HCl/mg ZW
<u>GlcNAc-MurNAc; (GlcNAc-MurNAc)₂</u>	4 N HCl, 100°C	Einschluß- rohr	14 h	1 ml HCl/mg Oligosaccharid
<u>N-Acetyl-Muraminsäure-äthylamid</u>	4 N HCl, 100°C	Einschluß- rohr	4 h	100 µl HCl/100 µg Substanz
<u>Peptidyl-Harz; Aminoacyl-Harz</u>	5 ml c. HCl u. 5 ml Dioxan	Rückfluß	12 h	5 ml c. HCl u. 5 ml Solvens/10 mg Polymer
<u>Peptidester, N-geschützte Peptide</u>	5 ml c. HCl u. 5 ml Solvens *)	Rückfluß	12 h	5 ml c. HCl u. 5 ml Solvens/1 mg Peptidderivat

*) Als Lösungsmittel verwendete man DMF, Dioxan, Dimethoxyäthan, DMSO, Äthylacetat.

20. Elektrophoretische Methoden

20.1. Dünnschichtelektrophorese

Dünnschichtelektrophorese wurde auf Celluloseplatten (Schichtdicke 0.1 mm; Merck) in einer Feuchtkammerapparatur (CAMAG) durchgeführt. Der Potentialgradient betrug etwa 23 V/cm, die Stromstärke 5-20 mA. Elektrolyte:

"pH 6.4"	Pyridin/Eisessig/Wasser	100/4/40	v/v/v
"pH 5.6"	Pyridin/Eisessig/Wasser	23/6/970	v/v/v
"pH 2.4"	Eisessig/Wasser	60/940	v/v

20.2. Papierhochspannungselektrophorese

Papierhochspannungselektrophorese wurde in einer Elektrophoreseapparat-
tur der Firma Hölzel, Dorfien, auf Whatman Papieren Nr. 1 und 3 MM
durchgeführt.

Elektrolyte:

"pH 1.5"	6 %-ige NaOH/90 %-ige HCOOH	3/2	v/v
"pH 2.7"	0.05 m Ammoniumformiat		

21. Chromatographische Methoden

21.1. Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographie wurde eindimensional auf Kieselgel-Fertig-
Platten, Schichtdicke 0.25 mm (Merck), durchgeführt. Laufmittel (Volu-
menverhältnisse):

A	Propanol-(1)/konz. Ammoniaklösung	84/37
B	Aceton/Eisessig	98/2
C	Chloroform/Methanol/Eisessig	85/10/5
D	Butanol-(1)/Eisessig/Wasser/Pyridin	15/3/12/10
E	Methanol/Chloroform	1/1
F	Propanol-(1)/Äthylacetat/Wasser	7/1/2
G	Äthylacetat/DMF/Wasser	65/25/10
H	Isopropanol/Chloroform/Eisessig	6/3/1
I	Butanol-(1)/Pyridin/Wasser	6/4/3
K	Chloroform/Eisessig	95/5
L	Phenol/Wasser	100/20
M	Butanol-(1)/Eisessig/Wasser	450/50/125
N	Butanol-(2)/33 %-ige Ammoniaklösung	150/60
O	Pyridin/Pentanol-(2)/Wasser	1/1/1

Präparative Papierchromatographie von N-Acetyl-Muraminsäure-äthylamid
führte man auf Whatman 3 MM Papier durch. Das zu trennende Substanzgemisch trug man strichförmig über die ganze Breite des Chromatographiebogens auf und führte die Auftrennung in Laufmittel (0) durch.

Die Analyse von Serumproben auf proteolytische Aktivität erfolgte durch eindimensionale absteigende Papierchromatographie auf Schleicher/Schüll-Papier 2043b MgI in Laufmittel

X n-Butanol/Pyridin/Wasser/Eisessig 60/40/30/3

21.3. Sprühmittel zur Identifizierung der chromatographierten Verbindungen

 dungen

Freie Aminosäuren und Peptide, Aminosäureester und Peptidester (primäre Aminogruppe) wurden mit einem Ninhydrin-Sprühreagenz der Zusammensetzung:

Wassergesättigtes n-Butanol/Eisessig/Ninhydrin 930 ml/70 ml/5 g

nachgewiesen. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte im Thermostaten bei 100 °C. Peptide mit N-terminalem Glycin erschienen dabei kurzzeitig als gelbe Flecken, die sich erst allmählich violett färbten.

Im Falle sehr säurelabiler Verbindungen verwendete man eine 0.2 %-ige Lösung von Ninhydrin in Aceton oder Äthanol (w/v).

Zur Überprüfung der Abwesenheit freier Aminogruppen in N-geschützten Verbindungen (sekundäre Aminogruppen) löste man 1 bis 10 µM in der gerade notwendigen Menge Solvens, trug die Lösung auf Whatman Nr. 1 Papier auf und sprühte mit Ninhydrin.

N-geschützte Aminosäuren und Peptide (sekundäre Aminogruppe) wurden mit einem Sprühreagenz nach Reindel-Hoppe nachgewiesen (100).

Lösung A 10 bis 14 %-ige Lösung von Natriumhypochlorit, 1:6 verdünnt;

Lösung B 50 : 50 Volumenteile von 1) und 2)

- 1) 1.68 g Kaliumjodid in 200 ml Wasser
- 2) 2 g o-Tolidin in 10 ml Eisessig und 200 ml Wasser
kurz vor Gebrauch mischen;

Die Chromatogramme sprühte man mit Lösung A, trocknete, und sprühte dann mit Lösung B nach.

Boc-Aminosäuren identifizierte man zusätzlich durch Sprühen der Chromatogramme vor und nach Abspaltung der Schutzgruppe mit HCl-Dämpfen mit 0.2 % Ninhydrin in Aceton (w/v). Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe setzte man die Chromatogramme in einer Küvette 10 Minuten den Dämpfen konzentrierter Salzsäure aus.

NPS-Derivate und DNP-Verbindungen waren durch ihre gelbe Eigenfärbung sichtbar. Zusätzlich konnten NPS-Derivate nach Abspalten der Schutzgruppe mit HCl (s.o.) mit Ninhydrin identifiziert werden.

NPS-Derivate, Carbobenzoxy-Derivate sowie Succinimidester identifizierte man zusätzlich im UV.

Peptide ließen sich auch mit Joddampf nachweisen.

N-acetylierte Amino Zucker und Oligosaccharide identifizierte man durch ihre Fluoreszenz unter UV-Bestrahlung nach Besprühen der Chromatogramme mit 0.5 N NaOH in Propanol/Äthanol (4:6; v:v) und 10 Minuten Entwicklung im Thermostaten bei 120 °C (135).

Anilin-Phtalat für reduzierende Zucker: 0.93 g Anilin und 1.66 g o-Phtalsäure löste man in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol. Die Chromatogramme sprühte man mit dieser Lösung und behandelte 10 Minuten bei 105 °C nach.

Reduzierende Zucker wurden auch mit ammoniakalischem Silbernitrat nachgewiesen (155).

Hydroxylamin-Eisen(III)-chlorid für Säureamide (75)

Lösung A: 20 g Hydroxylammoniumchlorid löste man in 50 ml Wasser, füllte mit Äthanol auf 200 ml auf und bewahrte die Lösung bei 4 °C auf.

Lösung B: 50 g Kaliumhydroxid löste man in möglichst wenig Wasser und füllte mit Äthanol auf 500 ml auf.

Sprühlösung I: 1 Vol. "A" mischte man mit 2 Vol. "B", filtrierte das ausgefallene Kaliumchlorid ab und bewahrte die erhaltene Sprühlösung im Kühlschrank auf.

Sprühlösung II: 10 g feinst-gepulvertes Eisen(III)-chlorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) löste man in 20 ml Salzsäure (36 %), schüttelte die Lösung solange mit Diäthyläther, bis eine homogene Mischung entstand und bewahrte die Lösung gut verschlossen auf.

Die Chromatogramme sprühte man mit I, trocknete kurz bei Zimmertemperatur und sprühte dann mit II nach.

Chlor-Pyrazolon-Cyanid für Säureamide (75)

Die Platte stellte man 2 bis 3 Minuten in eine Chloratmosphäre (aus Kaliumpermanganat und Salzsäure (25 %) hergestellt). Dann erwärmte man die Platte zur Entfernung des Chlor-Überschusses 5 Minuten im Trockenschrank bei 100 °C.

Lösung A: 0.2 m 1-Phenyl-3-methylpyrazolon-(5)-Lösung in Pyridin

Lösung B: 1 N Kaliumcyanid-Lösung

Man mischte gleiche Volumina "A" und "B" und besprühte das Chromatogramm bis zur beginnenden Transparenz.

21.4. Ionenaustauschchromatographie

21.4.1. Chromatographie an Dowex 50

Das Peptid Gly-L-Ala₂-D-Ala₂ chromatographierte man an Dowex 50. Die Methode von Schroeder (128) modifizierte man entsprechend dem Trennproblem.

Austauscherharz: Dowex 50 WX2, 200-400 mesh; Trennsäule: 120x2.5 cm;
Die Säule temperierte man mit Hilfe eines Heizmantels und eines Umwälz-
thermostaten auf 38 °C.

Das Austauscherharz brachte man mit 2 M Pyridin in die Pyridiniumform
und äquilibrierte dann mit 600 ml Pyridin-Acetat-Puffer pH 3.1 (64.5 ml
frisch destilliertes Pyridin und 1114 ml frisch destillierter Eisessig
ad 4 l mit Aqua dest.). 600 mg Peptid in 5 ml Wasser (pH mit HCl auf
2.0 eingestellt) gab man auf die Säule auf, eluierte mit Pyridin-Ace-
tat-Puffer pH 3.1 mit einer Durchflußrate von 35 ml/h und sammelte
Fraktionen von 3.5 ml.

21.4.2. Chromatographie an Dowex 1 (128)

- - - - -

Die Peptide Gly₄- ϵ -Acp und L-Ala₂- ϵ -Acp chromatographierte man an Dowex
1X2, 200-400 mesh, in einer Trennsäule der Abmessungen 100x1.5 cm bei
einer Säulentemperatur von 38 °C.

200 ml Austauscherharz behandelte man nacheinander mit 400 ml Wasser,
400 ml 0.5 N NaOH, 1 l Wasser, 400 ml 1 N Essigsäure, 400 ml Wasser und
1 l Puffer pH 8.4 (s.u.), und packte dann die Säule.

Die Säule äquilibrierte man mit 500 ml Puffer pH 8.4

Die Peptide löste man in 2 ml Puffer pH 8.4 auf, stellte den pH mit
NaOH auf 10.5 ein, gab die Probe auf die Säule auf und eluierte mittels
eines Stufengradienten mit den Puffern:

- 1) Puffer pH 8.4 60 ml N-Äthylmorpholin, 80 ml α -Picolin, 40 ml Pyri-
 (220 ml) din, 3.0 ml Eisessig ad 4 l Wasser; zur Entfernung
 von CO₂ leitete man durch den Puffer Stickstoff.
- 2) Puffer pH 6.5 gleiche Zusammensetzung wie oben, jedoch 37 ml Eis-
 (240 ml) essig.
- 3) 0.5 N Essigsäure
 (360 ml)

Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 3 ml, die Durchflußrate
50 ml/h.

21.4.3. Chromatographie an Amberlite IR 4B

- - - - -

Die Peptide L-Ala₃- ξ -Acp, Gly₅- ξ -Acp und L-Ala-Gly₄ chromatographierte man nach Abspalten der Schutzgruppe (15.) an Amberlite IR 4B, OH⁻-Form. Die Peptide löste man in 0.5 ml Aqua dest. auf, trug die Probe auf die Säule (40x1 cm) auf, und eluierte mit Wasser bei einer Durchflußrate von 50 ml/h.

Zu 21.4.1. mit 21.4.3.

Die Identifizierung der Peptide in den einzelnen Fraktionen erfolgte durch ein Ninhydrin-Reagenz (46).

In einer Lösung von 20 g Ninhydrin in 500 ml peroxidfreiem Methylglycol löste man 800 mg SnCl₂·2 H₂O in 500 ml Citratpuffer pH 5.0, 0.2 m (21.1 g Citronensäuremonohydrat + 200 ml 1 N NaOH ad 500 ml mit Aqua dest.). Zu jeweils 0.1 ml der einzelnen Fraktionen pipettierte man 1 ml der Ninhydrinlösung und inkubierte das Reaktionsgemisch im siedenden Wasserbad für 20 Minuten. Die Extinktion der Proben wurde nach 20 Minuten bei 578 nm gemessen.

21.4.4. Chromatographie von Lysozym-hydrolysiertem, dialysierbarem Pep-

- - - - -

tidoglycan von Micrococcus luteus an Amberlite CG 120

- - - - -

Zur Abtrennung von basischem und teilweise auch von neutralem Material aus der dialysierbaren (niedermolekularen) Fraktion von Lysozym-Hydrolysaten von tryptisch-gereinigter Zellwand von Micrococcus luteus (vgl. 18.3.4.) chromatographierte man an Amberlite CG 120, 200-400 mesh, H⁺-Form. Die Abmessungen des Säulenbettes betrugen 3.5x20 cm. Die Probe löste man in 500 ml Wasser, trug sie auf die Säule auf und eluierte mit 500 ml Wasser. Das Eluat konzentrierte man unter vermindertem Druck bei 40 °C und lyophilisierte dann.

21.5. Gelchromatographie an Sephadex (97)

21.5.1. Chromatographie von $(\text{L-Ala}_3\text{-}\xi\text{-Acp})_n$ -Protein, $(\text{Gly}_5\text{-}\xi\text{-Acp})_n$ -Protein und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}$ -RNase an Sephadex G-25 (108)

20 bis 250 mg Peptidyl-Protein löste man in 0.5 bis 7.0 ml 10 %-iger wässriger Essigsäure auf und chromatographierte mit demselben Solvens an Sephadex G-25 fine in einer Trennsäule der Abmessungen 100x1.0 cm. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 40 ml/Stunde. Fraktionen zu 2 ml sammelte man und bestimmte ihre Absorption in einem Durchflußphotometer bei 280 nm.

21.5.2. Chromatographie von $\text{L-Ala}_3\text{-}\xi\text{-Acp}$, $\text{Gly}_5\text{-}\xi\text{-Acp}$, L-Ala-Gly_4 , Gly-L-Ala-Gly , $\text{L-Ala}_2\text{-Gly}$ und L-Ala-Gly-L-Ala an Sephadex G-15

Die oben angeführten Peptide filtrierte man nach Abspalten der NPS-Schutzgruppe (15. bzw. 16.) an Sephadex G-15 in einer Säule der Abmessungen 80x1 cm. Die Peptide löste man in einem möglichst geringen Volumen 10 %-iger wässriger Essigsäure, eluierte mit diesem Solvens mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/Stunde und sammelte Fraktionen zu 2 ml. Die Identifizierung der Peptide in den einzelnen Fraktionen erfolgte mit dem in 21.4.3. beschriebenen Ninhydrin-Reagenz.

21.5.3. Chromatographie von GlcNAc-MurNAc und von $\text{GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc}$ an Sephadex G-15

Die Abtrennung von GlcNAc-MurNAc und von $\text{GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc}$ aus der dialysierbaren, an Amberlite CG 120 chromatographierten Lysozym-Hydrolysat-Fraktion von *ZW-tryp* von *Mc. luteus* (vgl. 18.3.5. und 21.4.4.) erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex G-15. Die Abmessungen der Trennsäule betrugen 2.5x100 cm. 100 mg Probe trug man in möglichst wenig Wasser auf die Säule auf, eluierte mit abgekochtem Wasser bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 8 ml /Stunde und sammelte Fraktionen zu

3 ml. Der Nachweis der Oligosaccharide in den einzelnen Fraktionen erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 220 nm.

Zu 21.5.1. mit 21.5.3.

Die Vorbehandlung der Sephadex-Gele und das Gießen der Säulen erfolgte wie in (97) ausführlich beschrieben.

22. Inkubation von GlcNAc-MurNAc und von GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc

mit Lysozym

Etwa 100 nm Oligosaccharide inkubierte man mit 10 µg Lysozym in 100 µl 0.05 m Ammoniumacetat, pH 6.2, für drei Stunden bei 37 °C. Dann fällte man das Lysozym mit 10 %-iger Trichloressigsäure, zentrifugierte ab (Eppendorf-Tischzentrifuge) und analysierte den Überstand papierchromatographisch.

23. Bestimmung von reduzierenden Gruppen nach der Ferricyanidmethode (8)

200 µl der neutralisierten Probe versetzte man mit folgenden Lösungen:

100 µl Lösung A: 500 mg $K_3Fe(CN)_6$ in 1 l Aqua dest.

100 µl Lösung B: 5.3 g Na_2CO_3 und 650 mg KCN in 1 l Aqua dest.

Das Gemisch inkubierte man 15 Minuten bei 100 °C, addierte dann

500 µl Lösung C: 1.5 g $FeNH_4(SO_4)_2$ und 1 g Natriumlaurylsulfat in 1 l
0.05 N H_2SO_4

Nach gründlichem Durchmischen ließ man die Lösung 25 Minuten bei Raumtemperatur stehen und bestimmte dann die Extinktion bei 690 nm. Als Vergleichssubstanz dienten 5 bis 10 nm N-Acetyl-Glucosamin, das einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{1\text{ cm}}^{690} = 90000$ besitzt. Das Disaccharid GlcNAc-MurNAc hat eine Reduktionsfähigkeit, die das 1.5-fache einer äquivalenten Menge von N-Acetyl-Glucosamin beträgt und gibt somit eine stärkere Farbreaktion (85,148). Dieser Faktor wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

24. Bestimmung von Aminosuckern mit dem Morgan-Elson-Reagenz (24)

Morgan-Elson-Reagenz: 16 g p-Diaminobenzaldehyd brachte man mit Eisessig auf ein Volumen von 95 ml und addierte dann 5 ml konzentrierter Salzsäure. Diese Stammlösung verdünnte man im Verhältnis 1:8 (v/v) mit Eisessig.

Die Probe, die 10 bis 75 nM Acetylaminosucker enthielt, löste man in 100 µl einer 1 %-igen $K_2B_4O_7$ -Lösung (p/v) und erhitzte 7 bzw. 30 Minuten bei 100 °C (N-Acetyl-Glucosamin bzw. Disaccharide). Nach schnellem Abkühlen des Reaktionsgemisches addierte man 0.5 ml Morgan-Elson-Reagenz und bestimmte nach 20 Minuten Inkubation bei 37 °C die Extinktion bei 578 nm. Als Standard dienten 25 nm N-Acetyl-Glucosamin. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt für GlcNAc $\epsilon_{1\text{ cm}}^{585} = 18000$, für das Disaccharid GlcNAc-MurNAc 9500 und für das peptidsubstituierte Disaccharid 5700 (85).

25. Hydrazinolyse (24)

Die Hydrazinolyse von Zellwänden zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren erfolgte wie bei Hammes (37) ausführlich beschrieben.

26. Dinitrophenylierung

26.1. Dinitrophenylierung der als Trägerproteine verwendeten Proteine

sowie der Peptidyl-Protein-Konjugate

Die Dinitrophenylierung erfolgte analog der von Ghuyssen et al. (24) für Peptide beschriebenen Methode. Den Gehalt an dinitrophenylierbaren Aminosäuren in den Proteinen und den Protein-Peptid-Konjugaten bestimmte man durch Vergleich des mit Hilfe des Aminosäureanalysators ermittelten Aminosäuregehalts von Hydrolysaten unbehandelter und dinitrophenylierter Proben.

26.2. Dinitrophenylierung von Zellwänden (147)

Die Bestimmung des Gehalts N-terminaler Aminosäuren in Zellwänden findet sich in zahlreichen Dissertationen aus dem Arbeitskreis (37,87,156) ausführlich beschrieben.

26.3. Quantitative Bestimmung N-terminaler Gruppen in Spaltprodukten

Lysozym-behandelter Zellwände

Die Spaltprodukte Lysozym-behandelter Zellwände nahm man in 125 μ l 1-%-iger $K_2B_4O_7$ -Lösung auf, versetzte mit 17 μ l einer Lösung von 130 μ l FDNB in 10 ml absolutem Äthanol, mischte gut durch und inkubierte im Wasserbad bei 60°C. Nach 30 Minuten säuerte man mit 0.5 ml 2 N HCl an und bestimmte die Extinktion bei 420 nm. N-Dinitrophenyl-Derivate besitzen einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{1\text{ cm}}^{420} = 5200$.

27. Desaminierung der als Trägerproteine verwendeten Proteine sowie der

Peptidyl-Proteine

5 mg Protein bzw. Peptidyl-Protein löste man in 0.5 ml Wasser, versetzte mit 1.5 ml gesättigter Natriumnitritlösung und 0.5 ml Eisessig und ließ das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Dann dialysierte man die Lösung gegen destilliertes Wasser und lyophilisierte. Den Substituierungsgrad der Peptidyl-Proteine bestimmte man durch Vergleich des mit Hilfe des Aminosäureanalysators ermittelten Lysingehalts von Hydrolysaten unbehandelter und desaminierten Proben.

28. Quantitative Bestimmung von D-Aminosäuren

Die quantitative Bestimmung von D-Aminosäuren in Zellwandhydrolysaten bzw. die Überprüfung auf Razemisierung bei synthetischen Peptiden erfolgte durch enzymatische Bestimmung der Konfiguration (70), wie in

(156) ausführlich beschrieben.

29. Absolutierung und Hochreinigung von Lösungsmitteln; Darstellung von

speziellen Reagenzien (76,91)

Wasserfreies Hydrazin (19): 25 g 80 %-iges Hydrazinhydrat versetzte man unter Schütteln mit 250 ml Toluol und 250 g Calciumoxid und ließ die Mischung über Nacht stehen. Dann kochte man das Gemisch unter Ausschluß von Feuchtigkeit drei Stunden unter Rückfluß und destillierte anschließend das Azeotrop aus Hydrazin und Toluol (Siedepunkt 90 bis 91 °C). Nach längerem Stehen bei 4 °C entmischten sich die beiden Phasen, das wasserfreie Hydrazin (untere Phase) wurde abpipettiert, eingefroren und im Exsikkator aufbewahrt.

Absolutes Methanol und Äthanol: Pro Liter setzte man 5 g Magnesiumspäne zu, kochte nach Abklingen der Reaktion drei Stunden unter Rückfluß, destillierte und bewahrte das absolute Äthanol bzw. Methanol über Molekularsieb 3 Å auf.

Absolutes Methylenchlorid: Methylenchlorid trocknete man über Calciumchlorid, destillierte und bewahrte über Molekularsieb 4 Å auf.

Absolutes Dimethylformamid: Dimethylformamid trocknete man über Kaliumcarbonat, destillierte und bewahrte über Molekularsieb 4 Å auf.

Absoluter Di-isopropyläther: Man trocknete über Calciumchlorid, destillierte und bewahrte über Calciumchlorid auf.

Absolutes Dimethoxyäthan: Man absolutierte über Calciumchlorid, destillierte und bewahrte über Calciumchlorid auf.

Absolutes Aceton: Man trocknete über Kaliumcarbonat, destillierte und bewahrte über Molekularsieb 3 Å auf.

Absolutes Äthylacetat: Man absolutierte über Natriumsulfat, destillierte und bewahrte über Molekularsieb 4 Å auf.

Absoluter Eisessig: Man trocknete über Kupfersulfat, destillierte und bewahrte über Molekularsieb 4 Å auf.

Absoluter Diäthyläther: Man absolutierte über Calciumchlorid, destillierte und bewahrte über Molekularsieb 4 Å auf.

Peroxidfreier Diäthyläther: Zur Entfernung von Peroxiden schüttelte man mit festem Kaliumhydroxid und destillierte anschließend.

Peroxidfreies Dioxan: Zur Darstellung peroxidfreien Dioxans verfuhr man wie für Diäthyläther angegeben.

Peroxidfreies Methylglycol: Zur Abtrennung von Peroxiden destillierte man vor Verwendung.

Zum Nachweis von Peroxiden versetzte man 1 ml der Äther mit 1 ml einer 10 %-igen wässrigen Kaliumjodidlösung. Gelbfärbung der Lösung zeigte die Anwesenheit von Peroxiden an.

Triäthylamin: Triäthylamin wurde vor Verwendung destilliert.

Gesättigter Chlorwasserstoff in Diäthyläther; 2 N HCl in Dioxan: In einem 50 ml Tropftrichter mit Druckausgleichsrohr und Waschflascheneinsatz leitete man getrockneten Chlorwasserstoff durch 35 ml Dioxan. Das Gasableitungsrohr war mit einem Calciumchloridrohr versehen. Nach Sättigung des Dioxans mit Chlorwasserstoff verdünnte man zur Bestimmung der Normalität ein Aliquot der HCl/Dioxanlösung 1:10 mit Wasser und titrierte 1 ml der verdünnten Säure mit 0.1 N NaOH und Phenolphthalein als Indikator. Man addierte die entsprechende Menge Dioxan und titrierte dann erneut zur Überprüfung der Normalität.

Eine gesättigte Lösung von Chlorwasserstoff in Diäthyläther stellte man in der oben beschriebenen Apparatur her durch Einleiten von getrocknetem Chlorwasserstoff in absoluten Diäthyläther.

Die Darstellung und Trocknung von Chlorwasserstoff ist unter (14.) beschrieben.

30. Analytische Methoden

Schmelzpunkte bestimmte man in einer Mikroskop-Schmelzpunktsapparatur bei einer Aufheizgeschwindigkeit von ca. 2°C/Minute. Alle Werte sind unkorrigiert.

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Aminosäuren diente der vollautomatische Aminosäureanalysator 120C der Firma Beckman.

Spezifische Drehwerte bestimmte man mit einem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter der Firma Zeiss, Oberkochen.

Mikroelementaranalysen wurden mit einem automatischen Analysator der Firma Carlo Erba durchgeführt. Die Proben trocknete man 24 Stunden bei 12 Torr bei 60°C. In der Regel wurden die Werte für Sauerstoff aus der Differenz zwischen 100 % und der Summe der Werte für C, H und N bestimmt.

IR-Spektren nahm man mit einem Beckman Infrarot-Spektralphotometer auf. Die Substanzen wurden als "KBr-Preßlinge" vermessen (ca. 1 mg Substanz/100 mg KBr).

31. Proteinbestimmung

31.1. Photometrische Bestimmung der Protein-Konzentration

Zur Bestimmung der Antikörperprotein-Konzentration wurde in einem Zeiss PMQ II Photometer die Extinktion bei 280 nm gemessen und die Konzentrationen dann unter Verwendung des Werts ($E_{1\text{ cm}}^{280} = 1.4$ für 1 mg/ml IgG) berechnet.

31.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Folin-Ciocalteus-Re-

genz

Die Proteinbestimmung erfolgte durch den von Hartree (40) modifizierten Test nach Lowry et al. (72).

32. Antiseren

Die Herkunft der verwendeten Antiseren wird nachfolgend angegeben:

Antiseren gegen Streptococcus A-variant K.H. Schleifer, Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität München;

B. Heymer, Abteilung Pathologie I, Universität Ulm;

D.G. Braun, Basel Institute for Immunology, Basel, Schweiz;

Antiseren gegen Staphylococcus aureus A. Grov, Universität Bergen, School of Medicine, Norwegen;
sowie eigene Herstellung;

Antiseren gegen Micrococcus luteus M. Wikler, Laboratoire de Physiologie animale, Universität Brüssel;

Antiseren gegen Kaninchen γ -Globulin von der Ziege E. Eder, MPI für Biochemie, München;

Antiseren gegen die synthetischen Antigene eigene Herstellung

- HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁
- HSA-(CH₂CO-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)₃₄
- (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA
- (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA
- (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase

Antiseren gegen die synthetischen Peptidyl-Proteine

Gruppen von zwei bis fünf Kaninchen (2.5-3.5 kg Körpergewicht, beiderlei

Geschlechts) immunisierte man mit den oben angeführten Peptidyl-Protein-Konjugaten. Die Tiere erhielten vier bis fünf intradermale Injektionen von je 1 ml (10 mg Antigen/Injektion) in vierzehn-tägigem Abstand. Das Antigen löste man in steriler physiologischer Kochsalzlösung, filtrierte steril (0.45μ Porenweite) und vermischte dann im Verhältnis 1:1 steril mit inkomplettem Freund's Adjuvant (Difco). Jeweils drei Tage nach Immunisierung der Kaninchen bestimmte man den Titer gegen das synthetische Antigen. Aus der Arterie des rechten Ohres entnahm man steril Blutproben von ungefähr 2 ml, das Serum wurde wie unten beschrieben gewonnen und dann durch Titration mittels passiver Hämagglutination (36.1.) der Titer der Seren bestimmt.

Ergab die Überprüfung des Antikörpertiters einen ausreichenden Wert, blutete man die Kaninchen aus. Einen Tag vor der Blutentnahme setzte man die Nahrung ab, um lipidfreies Serum zu erhalten. Die Tiere betäubte man mit Eunarcol (Casella-Riedel), die Halsschlagader wurde freiprepariert, durchtrennt, und das ausströmende Blut in 50 ml Zentrifugengläsern gesammelt.

Die Zentrifugengläser mit dem frischen Blut stellte man zur Beschleunigung des Gerinnungsprozesses eine Stunde bei 37°C in den Brutschrank, und bewahrte dann zur Zusammenballung des Blutkuchens 12 Stunden bei 4°C auf. Den Blutkuchen trennte man mit einem Glasstab vorsichtig von der Wand des Zentrifugenglases ab und dekantierte das überstehende Serum. Eine weitere Serumfraktion, die allerdings in der Regel durch lyisierte Erythrozyten stark rot gefärbt war, konnte durch Abzentrifugieren des Blutkuchens gewonnen werden. Die Seren zentrifugierte man zur Abtrennung restlicher Blutzellen 20 Minuten bei 48000 g und pipettierte den klaren Überstand ab.

Die Seren filtrierte man steril (0.45μ Porenweite), füllte Volumina von je 5 ml steril in Gläschen ab und bewahrte die Seren nach Zusatz von Natriumazid (0.05 %) bei -20°C auf.

Zur Sterilitätskontrolle der Seren beimpfte man zwei Reihen von Kulturröhrchen mit jeweils zwei Tropfen des zu überprüfenden Serums und bebrütete 10 Tage bei 30°C bzw. bei 37°C .

33. Isolierung von γ -Globulin aus Kaninchen-Antiserum

33.1. Ausfällung der γ -Globuline mit Ammoniumsulfat

10 ml Serum versetzte man mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung und ließ 12 Stunden bei 4 °C stehen. Dann zentrifugierte man ab (48000 g, 20 Minuten) und wusch das Sediment dreimal mit 50 % Ammoniumsulfat in Saline (0.85 % Natriumchlorid). Den Niederschlag löste man dann in 0.01 m Phosphatpuffer pH 7.5 auf und dialysierte zusammen mit den Überständen aus den vorhergegangenen Zentrifugationsschritten über Nacht gegen die gleiche Lösung. Die Dialyse setzte man solange fort, bis sich in dem Dialysepuffer kein Sulfat mehr nachweisen ließ (Bariumchlorid). Die dialysierten Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung überprüfte man mit Hilfe der Titration mittels passiver Hämagglutination (36.1.) auf Antikörperaktivität. Die weitere Reinigung der γ -Globuline erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose.

33.2. Abtrennung der γ -Globulinfraktion von anderen Serumproteinen

durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (138)

Vorbehandlung der DEAE-Cellulose

25 g Cellulose suspendierte man in 500 ml 0.1 N HCl, rührte 30 Minuten bei Raumtemperatur und saugte unter Anlegen von Vakuum in einer Schott-G-3-Fritte ab. Die Cellulose rührte man dann in 500 ml 0.1 N NaOH für 10 Minuten auf und filtrierte wie oben ab. Die Cellulose suspendierte man erneut in 0.1 N NaOH, saugte ab und wiederholte diese Behandlung einmal. Dann wurde die Cellulose in einer Schott-G-3-Fritte mit Aqua dest. bis zur neutralen Reaktion des Filtrats gewaschen und solange mit 0.005 m Phosphatpuffer pH 7.0 gewaschen, bis der pH der Waschflüssigkeit denselben Wert zeigte wie der Puffer. Anschließend entgaste man die Cellulose 30 Minuten durch Anlegen von Vacuum.

Packen und Äquilibrieren der Säule

Die in 0.005 m Phosphatpuffer pH 7.0 suspendierte Cellulose gab man mit

Hilfe eines Fülltrichters in einem Guß in die Säule (Abmessungen 50 x 2 cm). Nachdem sich die Cellulose abgesetzt hatte, äquilibrierte man die Säule mit 500 ml 0.005 m Phosphatpuffer pH 7.0.

Säulenlauf

5 ml der Proteinlösung trug man vorsichtig auf die Säule auf. Nachdem die Lösung in die Cellulose eingedrungen war, überschichtete man die Säulenoberfläche sorgfältig mit 0.005 m Phosphatpuffer pH 7.0. Die einzelnen Proteine eluierte man mit einem linear ansteigenden Gradienten. Der Gradientenmischer wurde mit folgenden Pufferlösungen gefüllt:

vordere Kammer: 400 ml 0.005 m Natriumphosphatpuffer pH 7.0

hintere Kammer: 400 ml 0.05 m Natriumdihydrogenphosphat in 0.05 m NaCl

Das Eluat sammelte man in Fraktionen zu je 5 ml. Die Extinktion der Proben wurde bei 280 nm in einem Durchflußphotometer gemessen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 30 ml/Stunde.

34. Fraktionierung der Antisera gegen die Peptidyl-Proteine - Abtrennung der gegen die Trägerproteine gerichteten Antikörper

Bei der Immunisierung von Versuchstieren mit den Peptidyl-Proteinen werden neben spezifisch gegen die eingeführten Peptidketten gerichteten Antikörpern auch Antikörper gegen den Proteinträger gebildet. Zur Abtrennung dieser "Anti-Trägerprotein-Antikörper" von den "Anti-Hapten-Antikörpern" bestimmte man im quantitativen Präzipitationstest (37.3.) mit dem Trägerprotein als Antigen den Äquivalenzpunkt und präzipitierte die "Anti-Trägerprotein-Antikörper" mit der für den Äquivalenzpunkt ermittelten Antigen (=Trägerprotein)-Konzentration. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (48000 g, 20 Minuten), zweimal mit PBS (s.u.) gewaschen und die Überstände vereint. Die Proteinlösung konzentrierte man durch Membranfiltration in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon); Membrantype PM 30, molekulare Trenngrenze 30000 MG.

Phosphat-gepufferte-Saline, 0.02 m Phosphat, pH 7.0 (PBS)

Lösung A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.2 m (27.6 g/l);

Lösung B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0.2 m (53.65 g/l);

33 ml Lösung A + 67 ml Lösung B + 8.5 g NaCl; Aqua dest. ad 1 l;

35. Immunaффinitätschromatographie

Die Isolierung spezifischer Antikörper aus Antiseren gegen HSA-($\text{CH}_2\text{CO-Gly}_5$)₃₁ erfolgte durch Adsorption der Seren an Sepharose-4B-(Pentaglycin)_n (vgl. 12.). 20 ml Immunadsorbens in 0.01 m PBS pH 7.3 suspendierte man in 40 ml Antiserum, rührte die Suspension über Nacht bei 4 °C und zentrifugierte bei 48000 g 20 Minuten ab. Die Sepharose wurde bei 4 °C mit PBS gewaschen, bis die Extinktion der Waschflüssigkeit bei 280 nm kleiner als 0.04 war. Zur Elution der Antikörper von dem Sepharose-Antikörper-Komplex suspendierte man die Sepharose in 20 ml einer 0.01 m Lösung von Pentaglycin in PBS, rührte 30 Minuten bei 37 °C und sammelte nach Zentrifugieren (48000 g, 20 Minuten) den Überstand. Dann suspendierte man die Sepharose in 12 ml einer 0.01 m Pentaglycinlösung und trennte die Antikörperfraktion wie oben beschrieben ab. In einem dritten Elutionsschritt suspendierte man die Sepharose in 20 ml 0.1 m Essigsäure und gewann die Antikörper wie oben angegeben. Die vereinigten Fraktionen der ersten und zweiten Elution und die Fraktion der Elution mit Essigsäure dialysierte man vier Tage gegen PBS unter häufigem Wechsel des Puffers. Zur Abtrennung gebildeter Niederschläge zentrifugierte man die dialysierten Lösungen (48000 g, 20 Minuten) und konzentrierte die Proteinlösungen durch Ultrafiltration (Membran PM 30, Amicon) auf eine Konzentration von etwa 2 mg Antikörperprotein/ml.

36. Agglutinationstests

36.1. Titration mittels passiver Hämagglutination (BDB-Technik) (141)

Bis-diazotiertes Benzidin (BDB)

36.8 mg Benzidin (0.2 mM) löste man in 0.5 ml 2 N HCl und 7.5 ml Aqua

dest. und kühlte im Eisbad auf 2 °C. Unter Rühren fügte man tropfenweise 2 ml einer Natriumtrinitritlösung hinzu (13.6 mg/ml) und rührte eine Stunde bei 2 °C. Den Endpunkt der Reaktion bestimmte man mit Jod-Stärkepapier. Die Lösung füllte man in kleinen Portionen ab und lagerte bei -20 °C (Lagerfähigkeit ein bis zwei Wochen).

Serum

Kaninchen-Antiseren und Seren von nicht immunisierten Tieren (Kontrollseren) dekomplementierte man durch Erhitzen auf 56 °C für 30 Minuten und absorbierte dann mit dem gleichen Volumen gepackter, in physiologischer Kochsalzlösung gewaschener Hammelerythrozyten für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Hammelerythrozyten

Hammelblut defibrinierte man durch Schütteln mit Glasperlen für eine Stunde, zentrifugierte dann die Erythrozyten aus dem defibrinierten Blut ab und wusch dreimal in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung. Als Gebrauchslösung diente eine 25 %-ige Erythrozytensuspension in gepufferter Saline (pH 7.2).

Beladung der Erythrozyten mit dem Antigen

5 ml einer 2.5 %-igen Erythrozytensuspension in 0.15 m Phosphatpuffer pH 7.2 kühlte man im Eisbad und mischte mit 1.2 ml BDB-Lösung (Stamm-lösung 1:10 verdünnt mit Saline). Nach genau 2 Minuten fügte man 0.1 % Peptidyl-HSA in 0.15 m Phosphatpuffer pH 7.2 hinzu (Antigen) und zentrifugierte nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Man wusch die Erythrozyten mit 1 % Normalserum in PBS pH 7.2 und suspendierte in dem gleichen Puffer.

Ausführung der Tests

Man stellte eine geometrische Verdünnungsreihe des Antiserums in gepufferter Saline her, mischte zwei Tropfen jeder Serumverdünnung mit einem Tropfen der beladenen Erythrozyten und bestimmte den Titer des Serums nach sechs Minuten. Die Titration führte man mit einer Takatsky-Mikrotitrator-Ausführung durch.

36.2. Latex-Agglutinationstest

Borat-NaCl-Puffer pH 8.2

50 ml 0.1 m Borsäure + 5.9 ml 0.1 N NaOH, ad 100 ml mit Aqua dest., pH = 8.2;

Latexlösung:

2.0 ml einer Latex-Suspension (Difco) mischte man mit 20 ml Aqua dest., zentrifugierte drei Minuten bei 8000 g und filtrierte den Überstand durch Whatman Nr. 40 Filterpapier.

γ -Globulinlösung oder spezifische Antikörper

Isoliertes γ -Globulin (33.) bzw. spezifische Antikörper (35.) dialysierte man vier Tage unter häufigem Wechsel des Puffers gegen Borat-NaCl-Puffer pH 8.2, um die Phosphat-gepufferte Saline gegen den Boratpuffer auszutauschen und stellte dann eine 0.5 %-ige Stammlösung in Boratpuffer her.

Verdünnen der ZW-Stammlösung (Antigen)

Von einer ZW-Stammlösung (10 μ g/ml) stellte man mit Boratpuffer eine geometrische Verdünnung her, das Volumen in den Verdünnungsröhrchen betrug jeweils 1.0 ml.

Ausführung des Tests

Man bereitete eine Mischung aus 0.1 ml Latex-Stammlösung, 0.5 ml 0.5-%-iger γ -Globulinstammlösung bzw. Stammlösung spezifischer Antikörper und 9.4 ml Boratpuffer und gab 1 ml dieses Gemisches zu 1 ml jeder Verdünnung der ZW-Stammlösung. Man schüttelte stark, inkubierte zwei Stunden bei 56 °C im Wasserbad, ließ die Röhrchen über Nacht bei 4 °C stehen und bestimmte am nächsten Tag nach leichtem Aufschütteln den Titer.

Neben Normalserum-Kontrolle führte man eine Latex-Kontrolle ohne Serumzugabe (nur Zugabe von Puffer) aus.

37. Präzipitationstests

In den folgenden Präzipitations- und Inhibitionstests wurden die Antigene mit Ausnahme von Peptidoglycan (vgl. 4.3. Solubilisierung von Peptidoglycan) in PBS gelöst.

37.1. Kapillarpräzipitationstest (69)

Der Kapillarpräzipitationstest wurde in 7.5 cm langen Kapillaren mit einem Durchmesser von 0.7 mm (Difco) durchgeführt. Zuerst zog man das Antiserum und dann ein gleiches Volumen der Antigenlösung auf. Das Ergebnis wurde nach zehn Minuten abgelesen. Im positiven Fall flockte innerhalb von fünf Minuten das Antigen-Antikörper-Präzipitat aus.

37.2. Agargelpräzipitation nach Ouchterlony

Jeweils 2 ml heißer 2 %-iger Agarose (Serva) in PBS goß man auf Objektträgern von 24 x 76 mm aus und stanzte nach Erkalten der Agarose mit Hilfe einer Schablone und einer Pasteurpipette Löcher in das Gel. In das mittlere Loch füllte man das zu testende Antiserum, in die äußeren Löcher Antigenlösung. Nach 24 Stunden in einer feuchten Kammer wurden die Präzipitationen abgelesen.

37.3. Quantitativer Präzipitationstest

Zu konstanten Volumina Antiseren (je nach Titer 0.2 bis 0.5 ml) gab man steigende Konzentrationen von in 0.2 ml PBS gelösten Protein-Peptid-Konjugaten bzw. solubilisiertem Peptidoglycan. Das Volumen der Ansätze füllte man mit PBS auf 1.1 ml auf. Das Reaktionsgemisch inkubierte man 30 Minuten bei 37 °C und zwei Tage bei 4 °C. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Präzipitate zentrifugierte man in der Kälte ab, dekantierte die Überstände vorsichtig ab, wusch zweimal bei 4 °C mit PBS und löste dann in 1.1 ml 0.1 N NaOH auf. Die Extinktion der Proben be-

bestimmte man nach 24 Stunden bei 280 nm.

37.4. Quantitativer Präzipitations-Hemmungstest

Zu den Hemmversuchen wurden die für den Äquivalenzpunkt ermittelten Antigen- und Antikörper-Mengen eingesetzt. Zu konstanten Mengen Antiserum gab man steigende Konzentrationen von Haptenen (Aminosäuren, Peptide, Zucker sowie deren Derivate), füllte das Volumen des Ansatzes mit PBS auf 0.9 ml auf und inkubierte das Reaktionsgemisch 30 Minuten bei 37°C. Dann setzte man den Proben eine konstante Antigen-Menge zu (Antigen in 0.2 ml PBS gelöst), und inkubierte weitere 30 Minuten bei 37°C und zwei Tage bei 4°C. Die gebildeten AG-AK-Präzipitate zentrifugierte man in der Kälte ab und arbeitete wie in 37.3. beschrieben weiter auf.

III. Zur Spezifität der "Anti-Glycanstrang-Antikörper"

=====

Problemstellung

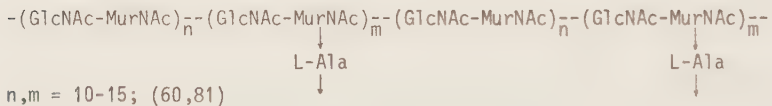
Frühere Untersuchungen zur Spezifität der gegen Peptidoglycan gerichteten Antikörper zeigten die antigenen Eigenschaften des Glycanstranges (27,29,57,102,118,167,168). Eine nähere Charakterisierung der immunologischen Eigenschaften des Polysaccharidstrangs des Peptidoglycans führte zu widersprüchlichen Ergebnissen verschiedener Arbeitskreise.

Die homologe Präzipitationsreaktion von Anti-Streptococcus A-variant-Seren (57) und die heterologe Präzipitation zwischen Antiserum gegen Streptococcus A oder Streptococcus A-variant und Peptidoglycan von Micrococcus luteus als Antigen (102) ließen sich spezifisch mit Acetyl-D-Glucosamin hemmen. Acetyl-D-Muraminsäure wies dagegen keine Hemmwirkung auf (102). Aus diesen Ergebnissen zog man die Schlußfolgerung, daß die gegen den Zuckerstrang des Peptidoglycans gebildeten Antikörper spezifisch gegen Acetyl-D-Glucosamin als determinanten Zucker gerichtet sind.

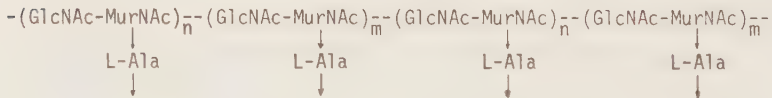
Dagegen fand Wikler (167,168), daß die Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen Micrococcus luteus und Peptidoglycan von Micrococcus luteus sich durch Acetyl-D-Muraminsäure stark hemmen ließ, während Acetyl-D-Glucosamin keine oder nur eine äußerst geringe Hemmwirkung zeigte. Er folgerte daraus, daß Acetyl-D-Muraminsäure und nicht Acetyl-D-Glucosamin die Spezifität der gegen den Zuckeranteil des Peptidoglycans gerichteten Antikörper bestimmt.

Die Klärung dieser kontroversen Ergebnisse soll in der vorliegenden Arbeit versucht werden. Antiseren gegen Micrococcus luteus und gegen Streptococcus A-variant sollen mit Antigenen verschiedener chemischer Struktur präzipitiert werden. Folgende Antigene sollen in den Präzipitationsreaktionen eingesetzt werden:

Peptidoglycan von Micrococcus luteus und Micrococcus lylae



Peptidoglycan von S.aureus, B. subtilis und Streptococcus A-variant



Chitin



Im Zuckerstrang des Peptidoglycans von Micrococcus luteus und Micrococcus lylae alternieren längere Abschnitte peptidsubstituierter Disaccharide mit unsubstituierten (60,81). Ein Teil der Muraminsäuremoleküle weist in diesen Peptidoglycanen somit freie, unsubstituierte Carboxylgruppen auf. Die Peptidoglycane von Streptococcus A-variant, Staphylococcus aureus und Bacillus subtilis dagegen besitzen ausschließlich Glycanstränge mit peptidsubstituierter Muraminsäure (vgl. obige Abbildung). Chitin ähnelt in seiner Struktur dem Zuckerstrang

des Peptidoglycans; es baut sich auf aus β -1,4-glycosidisch verknüpften N-Acetyl-D-Glucosaminmolekülen.

Die mit den oben aufgeführten Antigenen aus Antiseren gegen Micrococcus luteus sowie Streptococcus A-variant jeweils präzipitierbaren Antikörper sollen im quantitativen Präzipitationshemmungstest auf ihre Spezifität untersucht werden. Als Inhibitoren der quantitativen Präzipitationsreaktion werden verwendet:

N-Acetyl-D-Glucosamin	N-Acetyl-D-Galactosamin
N-Acetyl-D-Muraminsäure	N-Acetyl-D-Mannosamin
N-Acetyl-D-Muraminsäureäthylamid	
N-Acetyl-Chitobiose (GlcNAc-GlcNAc)	D-Glucose
N-Acetyl-Chitotetraose ((GlcNAc-GlcNAc) ₂)	α -Methyl-D-glucosid
GlcNAc-MurNAc	β -Methyl-D-glucosid
GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc	D-Cellobiose

Diese Untersuchungen sollen Aufschluß geben über die Spezifität der gegen den Zuckeranteil des Peptidoglycans gerichteten Antikörper und somit zur Klärung der oben angeführten Kontroverse beitragen.

Ergebnisse

=====

1. Synthese bzw. Isolierung nicht kommerziell erhältlicher Oligosaccharide bzw. Zuckerderivate

1.1. Acetyl-D-Muraminsäureäthylamid

Die Blockierung der freien Carboxylgruppe der Muraminsäure soll Aufschluß geben über den Beitrag der Carboxylfunktion zur Spezifität der "Anti-Glycanstrang-Antikörper". Die Synthese des Acetyl-D-Muraminsäureäthylamids erfolgte über das Säurechlorid durch Umsetzung von Acetyl-D-Muraminsäure mit Thionylchlorid und anschließender Reaktion mit Äthylamin zum Säureamid entsprechend folgender Gleichung (Abbildung 4):

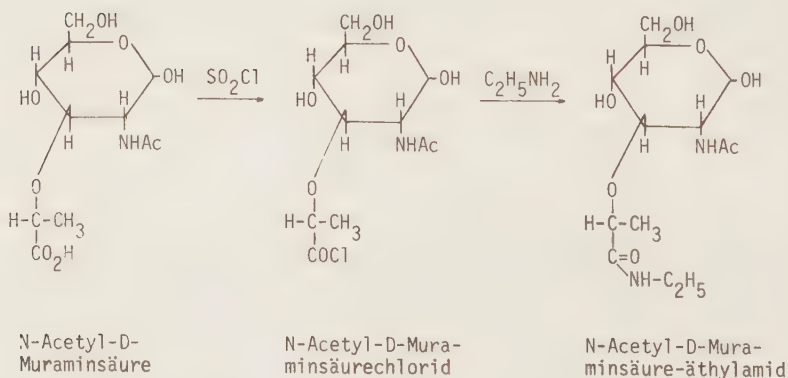


Abbildung 4: Synthese von Acetyl-D-Muraminsäureäthylamid

Die Umsetzung von Acetyl-Muraminsäure mit Thionylchlorid erschien wegen eventueller Nebenreaktionen der Hydroxylgruppen problematisch. Zur Überprüfung auf derartige Seitenreaktionen setzte man N-Acetyl-Glucosamin den Reaktionsbedingungen der Säurechlorid-Darstellung aus und analysierte dann das Reaktionsprodukt auf Identität mit N-Acetyl-Glucosamin.

Die IR-Spektren von authentischem N-Acetyl-Glucosamin und von N-Acetyl-Glucosamin, das man den Reaktionsbedingungen der Säurechlorid-Darstellung aussetzte, besitzen eine genau gleiche Bandenlage. Die unveränderte "Amid I"-Bande bei 6.2μ weist auf die Stabilität der N-Acetyl-Gruppe unter den gegebenen Reaktionsbedingungen hin. Im Bereich von $7-10 \mu$, dem sogenannten "finger-print-Gebiet", finden sich die C-X Valenzschwingungen. Eine Veränderung einer C-OH Gruppe bzw. das Auftreten einer C-Cl Bindung sollte in diesem Bereich eine Bandenänderung hervorrufen. Die identische Bandenlage in beiden Spektren gerade im "finger-print-Gebiet", das auf Grund der zahlreichen Deformations- und Kopplungsschwingungen besonders wichtig für Identitätsbeweise durch IR-Vergleich ist, zeigt an, daß eine Veränderung von N-Acetyl-Glucosamin nicht erfolgte (vgl. Abbildung 5, S. 74).

Papierchromatographie von Acetyl-Glucosamin, das man mit Thionylchlorid den Reaktionsbedingungen der Acetyl-Muraminsäurechlorid-Darstellung aussetzte, zeigt ebenfalls die Stabilität von Acetyl-Glucosamin während der Inkubation. Chromatographie in den Laufmitteln (O) und (P) und anschließender Nachweis mit Hoppe-Reindel-Reagenz (sekundäre Aminogruppen), Anilin-Phtalat (reduzierende Zucker) und alkoholischer NaOH (Fluoreszenz von Acetyl-Aminozuckern) ergibt einen identischen Substanzfleck mit $R_{\text{GlcNAc}} = 1.0$.

Diese Befunde lassen Nebenreaktionen der Hydroxylgruppen bzw. der Säureamid-Funktion (Acetylaminogruppe) während der Reaktion mit Thionylchlorid ausschließen.

Das synthetische N-Acetyl-Muraminsäureäthylamid erweist sich nach Abtrennung freier Acetyl-Muraminsäure (vgl. S. 48) als dünnschicht-chro-

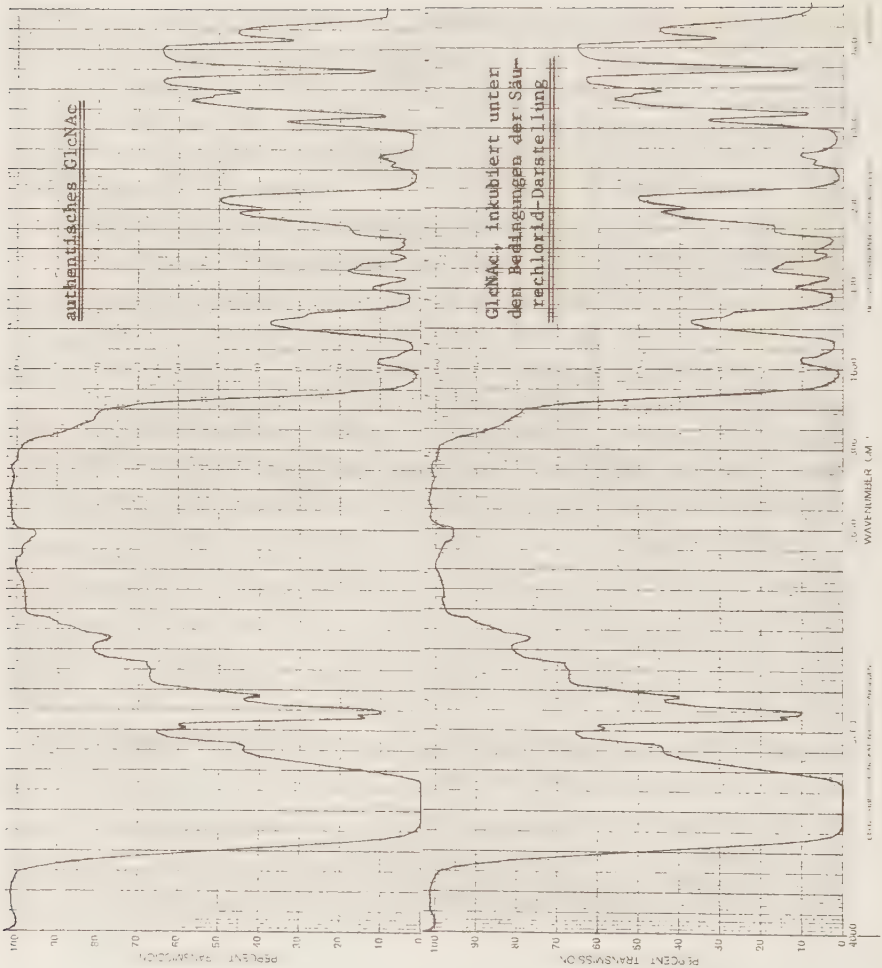


Abbildung 5. IR-Spektren von authentischem N-Acetyl-D-Glucosamin (oben) und von N-Acetyl-D-Glucosamin, inkubiert mit Thionylchlorid unter den Reaktionsbedingungen der Säurechlorid-Darstellung (unten)

matographisch und dünn-schicht-elektrophoretisch einheitlich (Tabelle 12).

Tabelle 12. Dünn-schicht-chromatographie und -elektrophorese von N-Acetyl-Muraminsäureäthylamid

Nachweis der Substanzflecke mit	R _{GlcNAc} ^{a)}	m _{GlcNAc} ^{b)}
Ninhydrin (prim. Aminogruppen)	--	--
Reindel-Hoppe-Reagenz (sek. Aminogruppen)	0.81	3.14
alkalisches Silbernitrat (reduzierende Zucker)	0.81	3.13
alkoholische NaOH (Fluoreszenz v. Acetylaminozuckern)	0.81	3.14
Hydroxyl-Eisen(III)chlorid (Säureamide)	0.80	3.14
Chlor-Pyrazolon-Cyanid (Säureamide)	0.81	3.13

- a) Dünn-schicht-chromatographie in Laufmittel: Pyr:Pe(2)OH:H₂O = 1:1:1;
 b) Dünn-schicht-elektrophorese in Puffer: Pyr:HOAc:H₂O = 23:6:970; pH = 5.6;

Das Auftreten von Muraminsäure nach saurer Hydrolyse von N-Acetyl-Muraminsäureäthylamid stellt einen weiteren Hinweis auf die Identität des synthetischen N-Acetyl-Muraminsäureäthylamids dar.

1.2. GlcNAc-MurNAc und GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc

Die Isolierung des Disaccharids GlcNAc-MurNAc und des Tetrasaccharids GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc aus Zellwänden von Micrococcus luteus zeigt das Schema in Abbildung 6 (S. 76).

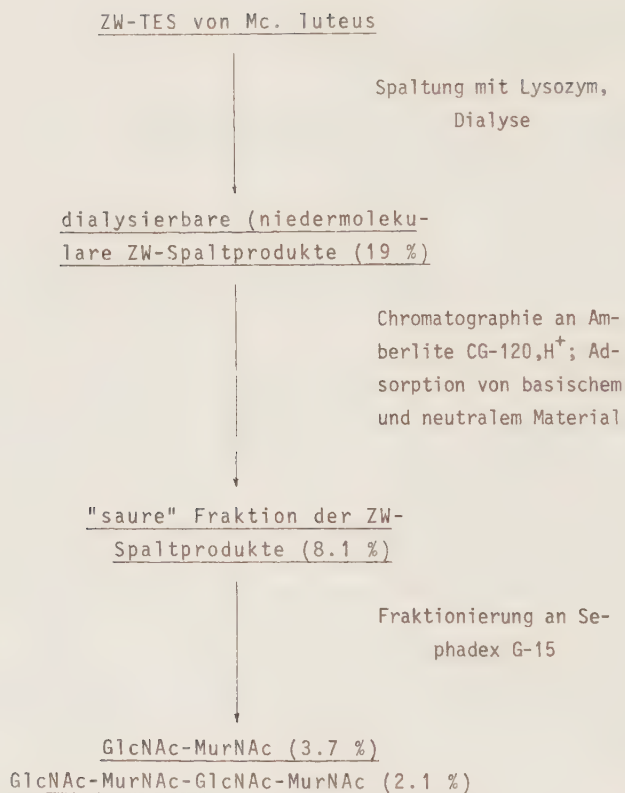


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Isolierung von GlcNAc-MurNAc und GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc aus Zellwänden von Micrococcus luteus. Die Ausbeuten in Klammern beziehen sich auf Zellwand-Trockengewicht.

Peptidoglycan von Micrococcus luteus unterwarf man der Spaltung mit Lysozym. Nach zwölf Stunden Reaktionszeit dialysierte man den Reaktions-

ansatz kontinuierlich während der weiteren Reaktion (zwölf Stunden) und entzog dadurch niedermolekulares Material der weiteren Hydrolyse. Die Ausbeute der Tetrasaccharidfraktion ließ sich dadurch wesentlich erhöhen. Basisches und neutrales Material adsorbierte man an einem sulphonierten Ionenaustauscher in der H^+ -Form und fraktionierte nicht gebundene Bestandteile an Sephadex G-15. Die Di- und Tetrasaccharidfraktion rechromatographierte man an Sephadex G-15 und analysierte die Verbindungen dann auf Reinheit und Identität (Tabelle 13).

Tabelle 13 Analytische Daten der isolierten Oligosaccharide GlcNAc-MurNAc und GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc

	Disaccharid	Tetrasaccharid
<u>Papierchromatographie</u> BuOH/HOAc/H ₂ O=25/6/25	1 Fleck m. $R_{GlcNAc} = 0.98^*)$	1 Fleck m. $R_{GlcNAc} = 0.51^*), +)$
<u>Aminozucker-u. Aminosäurezusammensetzung</u>	GlcNH ₂ 1.0 MurNH ₂ 0.95 Ala, Glu, Lys, Gly = 0	GlcNH ₂ 1.0 MurNH ₂ 0.94 Ala 0.1 Glu 0.05 Gly 0.04 Lys 0.04
<u>Inkubation m. Lysozym</u>	keine Reaktion $R_{GlcNAc} = 0.98$	Spaltung in Disaccharide m. $R_{GlcNAc}=0.97$; schwacher Tetrasaccharidfleck;
<u>molarer Extinktionskoeffizient</u>		
<u>Morgan-Elson-Reaktion</u> (N-Acetylaminozucker)	$\varepsilon_{1\text{ cm}}^{585} = 9460$ (Lit. 9500)	$\varepsilon_{1\text{ cm}}^{585} = 950$ (Lit. 1000)
<u>Park-Johnson-Reaktion</u> (Reduktionsgruppen)	$\varepsilon_{1\text{ cm}}^{690} = 137600$ (Lit. 137700)	$\varepsilon_{1\text{ cm}}^{690} = 104400$ (Lit. 105300)

- Zu Tabelle 13 *) Nachweis der Substanzflecke durch Fluoreszenz nach Behandlung mit alkoholischer NaOH;
- +) Papierelektrophorese des Tetrasaccharids in 0.05 m Ammoniumformiat pH 2.7 zeigte zusätzlich zur Substanzbande eine äußerst schwache, Ninhydrin-positive Bande auf.

1.3. N-Acetyl-Chitobiose und N-Acetyl-Chitotetraose

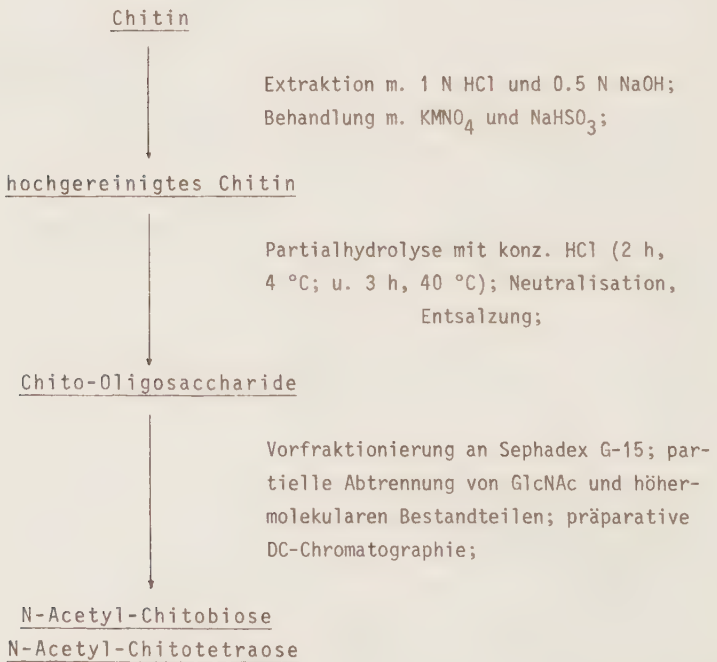


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Isolierung der N-Acetyl-Chitobiose und der N-Acetyl-Chitotetraose

Die Isolierung der N-Acetyl-Chitobiose und der N-Acetyl-Chitotetraose erfolgte durch Fraktionierung eines Partialhydrolysats von hochgereinigtem Chitin, wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Ein Aliquot des hochgereinigten Chitins unterwarf man der Totalhydrolyse und untersuchte das Hydrolysat auf Ninhydrin-positive Substanzen (Aminosäureanalysator) bzw. auf Zucker (DC-Chromatographie, Anfärbung mit alkalischem Silbernitrat). In beiden Fällen ergab sich Glucosamin als alleiniger Bestandteil.

Die Einheitlichkeit der isolierten Chitoooligosaccharide zeigte man durch Dünnschichtchromatographie. $R_f = 0.46$ (P); $R_f = 0.76$ (O); für Acetylchitobiose; $R_f = 0.27$ (o); $R_f = 0.08$ (P); für Acetylchitotetraose;

2. Untersuchung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Antiseren gegen Micrococcus luteus sowie Streptococcus A-variant und verschiedenen Glycan-Antigenen

Peptidoglycan weist neben Anteilen des Glycanstranges die Peptiduntereinheit und die Interpeptidbrücke als antigene Determinante auf (41, 117, 118, 122, diese Arbeit, Teil IV). Der Hauptanteil der gegen Peptidoglycan gerichteten Antikörper besitzt in der Regel Spezifität gegen das nicht an der Quervernetzung beteiligte Pentapeptid der Peptiduntereinheit mit C-terminalem D-Alanyl-D-Alanin.

Alle bisher durchgeführten Untersuchungen anderer Arbeitskreise zur Spezifität der "Anti-Glycanstrang-Antikörper" erfaßten bei der quantitativen Präzipitationsreaktion diese, gegen den Peptidteil des Peptidoglycans gerichteten Antikörper, mit.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die isolierte Untersuchung der "Anti-Glycanstrang-Reaktion" ohne störenden Einfluß von Antikörperpopulationen mit Spezifität gegen weitere Determinanten. Antiseren gegen Streptococcus A-variant sowie gegen Micrococcus luteus zeigen ei-

ne starke Präzipitationsreaktion mit dem synthetischen Antigen HSA-(CH₂CO-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)₃₄. Die quantitative Präzipitationshemmungsreaktion zeigte, daß diese Kreuzreaktion auf gemeinsame antigene Determinanten im Peptidoglycan der zur Immunisierung verwendeten Bakterien und des synthetischen Antigens zurückzuführen ist. Beide Makromoleküle besitzen Pentapeptide mit C-terminalem D-Alanyl-D-Alanin. Durch Adsorption der Seren an dem synthetischen Antigen ließen sich deshalb Antikörper mit Spezifität gegen das nicht an der Quervernetzung beteiligte Pentapeptid spezifisch abtrennen.

Zur Erzeugung von Antikörpern gegen den Glycanstrang immunisierten wir mit Streptococcus A-variant und Micrococcus luteus. Die Antigene Chitin und Peptidoglycan von Bacillus subtilis besitzen mit den Peptidoglycanen der als Vakzine verwendeten Bakterien nur ein Glycanpolymer als gemeinsame antigene Determinante. Durch Verwendung dieser Antigene können aus den Antiseren spezifisch Antikörper präzipitiert werden, die nur gegen den Zuckerstrang des Peptidoglycans gerichtet sind.

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die quantitativen Präzipitationsreaktionen der zuvor an HSA-(CH₂CO-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)₃₄ adsorbierten Seren von Streptococcus A-variant bzw. von Micrococcus luteus mit verschiedenen Glycanantigenen.

Antiseren gegen Micrococcus luteus ergeben eine sehr starke Präzipitationsreaktion mit dem homologen Antigen (Micrococcus luteus) sowie mit Peptidoglycan von Micrococcus lylae. Die Mureine von Streptococcus A-variant, Staphylococcus aureus und von Bacillus subtilis sowie Chitin zeigen eine starke Präzipitationsreaktion mit Antiserum gegen Micrococcus luteus, sie ist jedoch deutlich schwächer als diejenige mit Peptidoglycan von Micrococcus luteus oder Micrococcus lylae.

Bei der Untersuchung der Präzipitationsreaktionen zwischen Antiserum gegen Streptococcus A-variant und Peptidoglycanen aller untersuchten Bakterienstämme sowie mit Chitin als Antigen erhielten wir in allen Fällen etwa gleich starke Präzipitationsreaktionen.

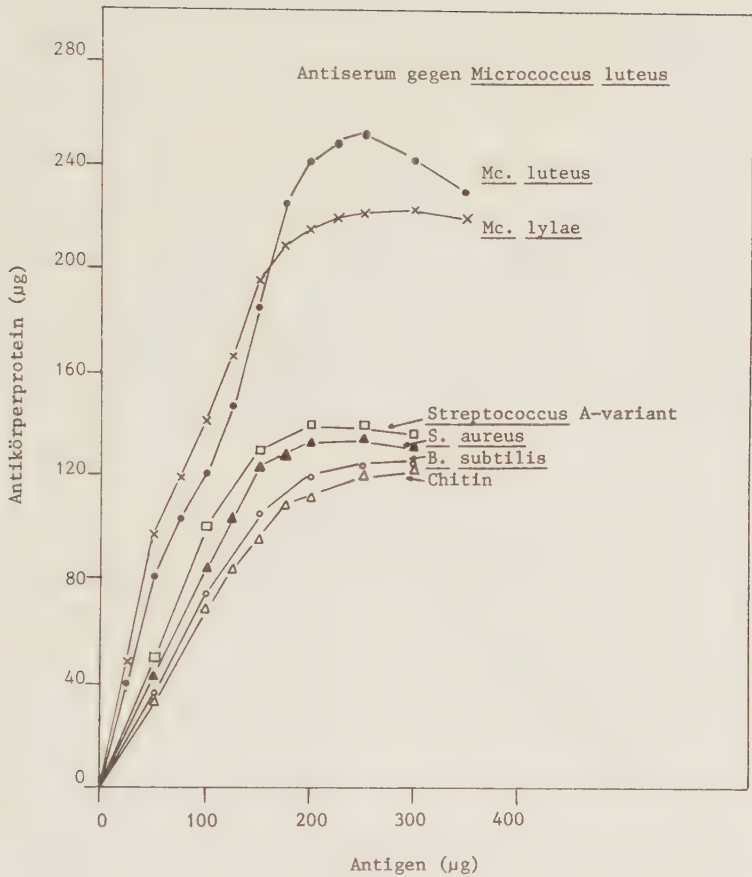


Abbildung 8. Präzipitationsreaktion zwischen Anti-Micrococcus luteus-Serum und Peptidoglycan von Mc. luteus, Mc. lylae, Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis sowie Chitin als Antigen

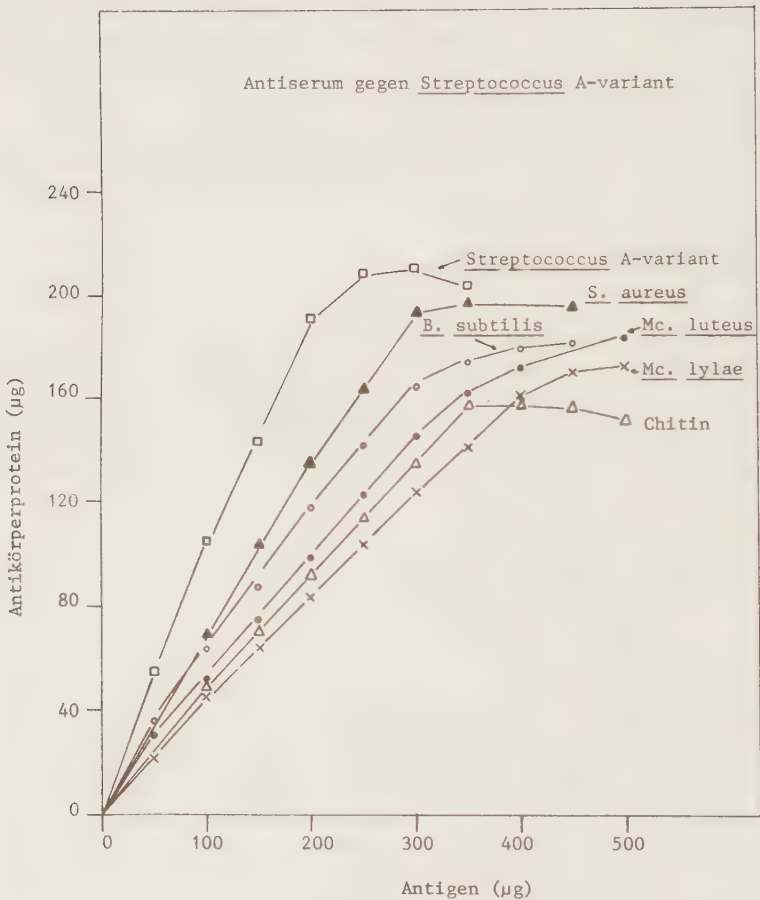


Abbildung 9. Präzipitationsreaktion zwischen Anti-Streptococcus A-variant-Serum, und Peptidoglycan von Mc. luteus, Mc. lylae, Streptococcus A-variant, S. aureus, Bacillus subtilis sowie Chitin als Antigen

Zur näheren Charakterisierung der Spezifität der mit den jeweiligen Antigenen präzipitierbaren Antikörperpopulationen adsorbierte man die Antiseren mit der jeweils für den Äquivalenzpunkt ermittelten Konzentration eines Antigens und prüfte den Überstand auf präzipitierbare Antikörper.

Absorbiert man die Antiseren gegen Streptococcus A-variant an den Peptidoglycanen von Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis, Mc. luteus, Mc. lylae oder an Chitin, erhält man in den anschließenden Präzipitationsreaktionen mit Chitin oder den Peptidoglycanen der oben aufgeführten Bakterien als Antigene keine oder nur sehr schwache Präzipitationen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß mit den jeweiligen Antigenen, unabhängig von der Verschiedenheit ihrer chemischen Struktur, aus den Antiseren gegen Streptococcus A-variant weitgehend Antikörperpopulationen sehr ähnlicher oder gleicher Spezifität präzipitiert werden.

Die Antiseren gegen Micrococcus luteus zeigen im Gegensatz zu den Anti-Streptococcus A-variant-Seren nach Adsorption an Peptidoglycane der oben aufgeführten Bakterien sowie an Chitin ein unterschiedliches Präzipitationsverhalten (Tabelle 13, Seite 84).

Nach Adsorption der Micrococcus luteus-Antiseren an Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis, Mc. luteus, Mc. lylae sowie an Chitin erhält man in der anschließenden Präzipitation mit Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis oder mit Chitin als Antigen wie im Falle der Streptococcus A-variant-Seren keine oder nur eine sehr schwache Reaktion. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Micrococcus luteus-Antiseren ebenso wie die Antiseren gegen Streptococcus A-variant eine Antikörperpopulation mit Spezifität gegen eine antigene Determinante besitzen, die allen verwendeten Antigenen gemeinsam ist.

Abweichend von den für die Streptococcus A-variant-Antiseren erhaltenen Ergebnissen erweist sich im Fall der Antiseren gegen Micrococcus luteus die Präzipitation mit Peptidoglycan von Mc. luteus oder Mc. lylae nur durch vorherige Adsorption der Seren an Peptidoglycan von Mc.

Tabelle 13. Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen Micrococcus luteus und verschiedenen Peptidoglycanen sowie Chitin nach vorheriger Adsorption der Seren an verschiedenen Antigenen

	<u>Micrococcus luteus</u> -Antiserum adsorbiert an					Chitin
	PG von <u>Str. A-v</u>	PG von <u>S. aur</u>	PG von <u>B. subt</u>	PG von <u>Mc. lut</u>	PG von <u>Mc. lyl</u>	
<u>Präzipitation</u> mit PG von						
<u>Str. A-v</u>	+	+	+	+	+	+
<u>S. aur</u>	+	+	+	+	+	+
<u>B. subt</u>	+	+	+	+	+	+
<u>Mc. lut</u>	+++	+++	+++	+	+	+++
<u>Mc. lyl</u>	+++	+++	+++	+	+	+++
bzw m. Chitin	+	+	+	+	+	+

Abkürzungen: PG = Peptidoglycan; Str. A-v = Streptococcus A-variant;
S. aur = S. aureus; B. subt = B. subtilis; Mc. lut = Mc. luteus; Mc. lyl = Mc. lylae;

± = negative oder nur sehr schwache positive Reaktion;
+++ = starke Präzipitation

luteus oder Mc. lylae als hemmbar. Nach Adsorption der Seren an Chitin oder an Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis läßt sich mit Peptidoglycanen von Mc. luteus oder Mc. lylae aus den Micrococcus luteus-Antiseren eine Antikörperpopulation mit Spezifität gegen eine weitere antigene Determinante präzipitieren. Diese determinante Gruppe kommt nur in den Peptidoglycanen von Mc. luteus und Mc. lylae, nicht jedoch in den Peptidoglycanen von S. aureus, B. subtilis, Streptococcus A-variant sowie in Chitin vor.

3. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktionen zwischen Antise-

ren gegen Streptococcus A-variant sowie gegen Micrococcus luteus

und verschiedenen Glycan-Antigenen

Aus den Antiseren gegen Streptococcus A-variant sowie gegen Micrococcus luteus läßt sich mit Chitin als Antigen sowie mit Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, Mc. luteus, Mc. lylae, S. aureus, B. subtilis in allen Fällen spezifisch Antikörperprotein präzipitieren (vgl. Abschnitt III. 2. dieser Arbeit). Die Spezifität dieser Antikörperpopulationen, die mit diesen strukturell verschiedenen Antigenen jeweils aus den Antiseren präzipitiert werden, soll nun durch Hapten-Hemmung der jeweiligen quantitativen Präzipitationsreaktion näher charakterisiert werden. Tabelle 14, Seite 86, sowie die Abbildungen 10,11 (Seite 87,88) und 12,13 (Seite 90,91) zeigen diese quantitativen Präzipitations-Hemmungsreaktionen.

Tabelle 14, S. 86 und Abbildungen 10,11, S. 87 und 88

Die Präzipitationsreaktionen zwischen Antiseren gegen Streptococcus A-variant und Chitin als Antigen sowie Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis, Mc. luteus, Mc. lylae lassen sich in allen Fällen wirksam mit N-Acetyl-Glucosamin hemmen, während N-Acetyl-Muraminsäure nur eine äußerst schwache Hemmwirkung zeigt. Die homologe Reihe der Chitosaccharide N-Acetyl-Glucosamin, N-Acetyl-Chitobiose und

Streptococcus A-variant-Antiserum										Micrococcus luteus-Antiserum									
präzipitiert mit																			
	PG von Str.-A-v	PG v. S.aur	PG von B.subt	PG von Mc.lut	PG von Mc.lyl	Chit	PG von Str.-A-v	PG v. S.aur	PG von B.subt	Chit	PG von Mc.lut	PG von Mc.lyl							
GlcNAC	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+							
MurNAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
(MurNAC)-NH-Et	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-							
GlcNAC-GlcNAC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
(GlcNAC-GlcNAC) ₂	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
GlcNAC-MurNAC	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++							
(GlcNAC-MurNAC) ₂	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++							

Tabelle 14. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Streptococcus A-variant-Antiserum bzw. gegen Micrococcus luteus-Antiserum und verschiedenen Antigenen. PG = Peptidoglycan; Str.-A-v = Streptococcus A-variant; S.aur = S. aureus; B.subt = B. subtilis; Mc.lut = Mc. luteus; Mc.lyl = Mc. lylae; Chit = Chitin;

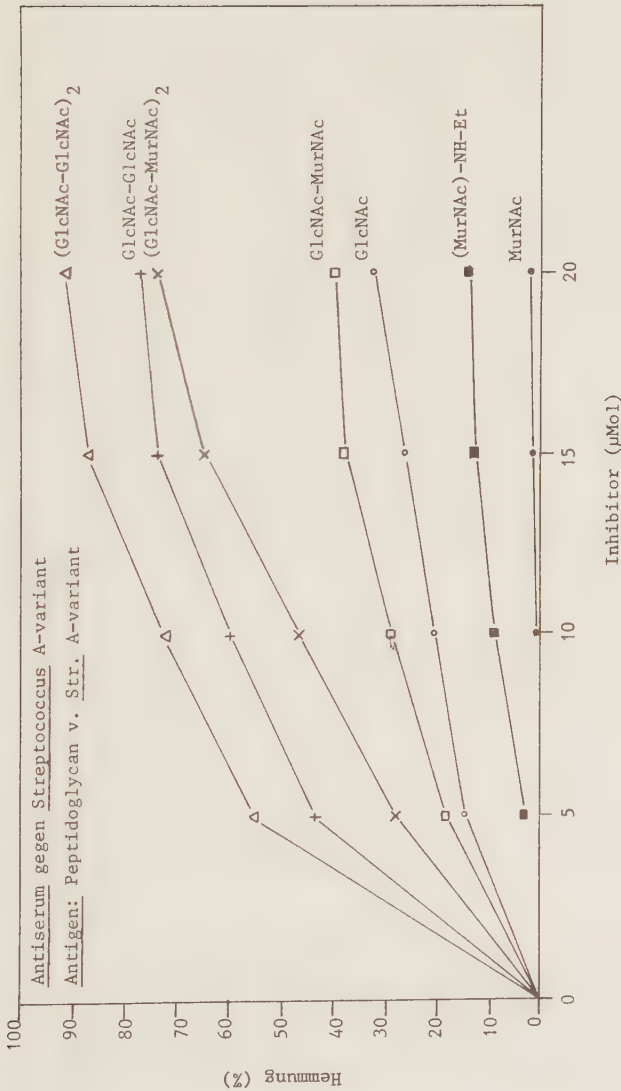


Abbildung 10. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Streptococcus A-variant-Anti-serum und Peptidoglycan von Streptococcus A-variant

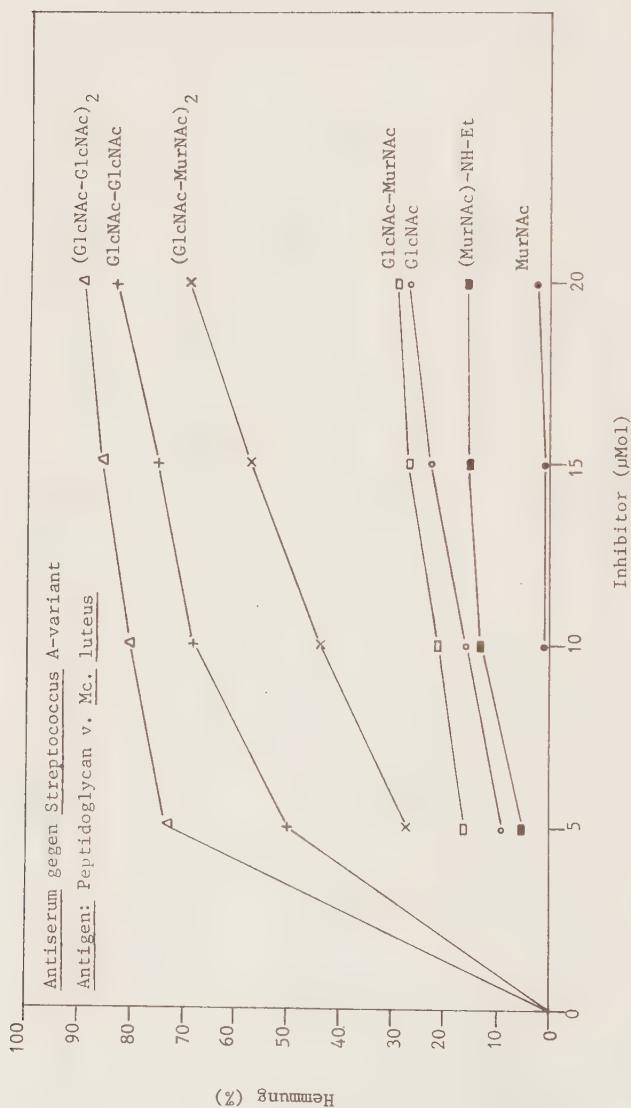


Abbildung 11. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Streptococcus A-variant-Anti-serum und Peptidoglycan von Mc. luteus

N-Acetyl-Chitotetraose weist ein ähnliches Hemmverhalten auf; die Hemmwirkung nimmt vom Monomeren zum Tetrameren leicht zu.

Vergleicht man die Hemmung von N-Acetyl-Glucosamin/N-Acetyl-Muraminsäure, von N-Acetyl-Chitobiose/GlcNAc-MurNAc und von N-Acetyl-Chitotetraose/GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc, so ergibt sich deutlich ein negativer Einfluß der Muraminsäure auf die Hemmwirkung. Die vergleichende Hemmung der quantitativen Glycan-Präzipitationsreaktion mit N-Acetyl-Muraminsäureäthylamid (Carboxylgruppe der Muraminsäure amidiert) und mit N-Acetyl-Muraminsäure (freie, unsubstituierte Carboxylgruppe) zeigt die Bedeutung von Carboxyl-substituierten Muraminsäuremolekülen für die Affinität von Antikörpern mit Spezifität gegen den Glycanstrang des Peptidoglycans von Streptococcus A-variant.

Diese Ergebnisse der Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Streptococcus A-variant-Antiseren und den verschiedenen Antigenen (Chitin, Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis, Mc. luteus, Mc. lylae) zeigen, daß mit allen Antigenen, unabhängig von der Verschiedenheit ihrer chemischen Struktur, aus den Antiseren Antikörperpopulationen mit gleicher Spezifität präzipitiert werden.

Abbildung 10 und 11 zeigt nur die Präzipitations-Hemmungsreaktion zwischen Streptococcus A-variant-Antiserum und den Peptidoglycanen von Streptococcus A-variant sowie von Mc. luteus, da alle eingesetzte Antigene sehr ähnliche Hemmkurven ergeben (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14, S. 86 und Abbildungen 12,13, S. 90 und 91

Im Gegensatz zu den Streptococcus A-variant-Antiseren erhielten wir für die Antiseren gegen Micrococcus luteus unterschiedliche Ergebnisse.

Die mit Chitin als Antigen sowie mit Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis aus den Micrococcus luteus-Antiseren jeweils präzipitierbaren Antikörperpopulationen sind gegen die gleiche antigene Determinante gerichtet. Übereinstimmend lassen sich die Präzipitationsreaktionen mit den Chitosacchariden N-Acetyl-Glucosamin, N-

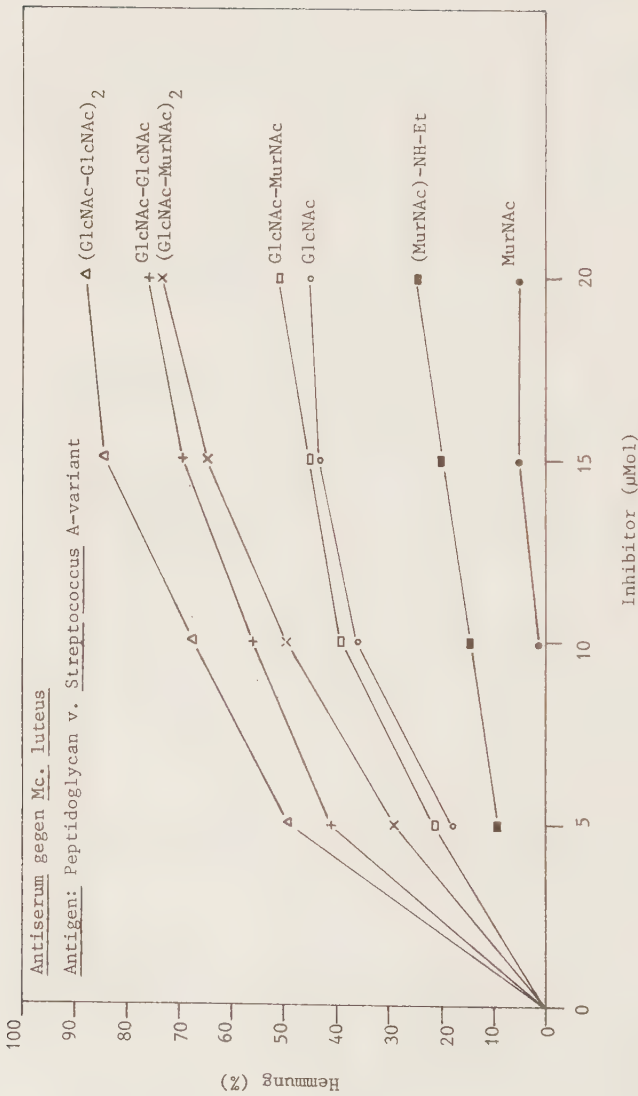


Abbildung 12. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Mc. luteus-Antiserum und Peptidoglycan von Streptococcus A-variant

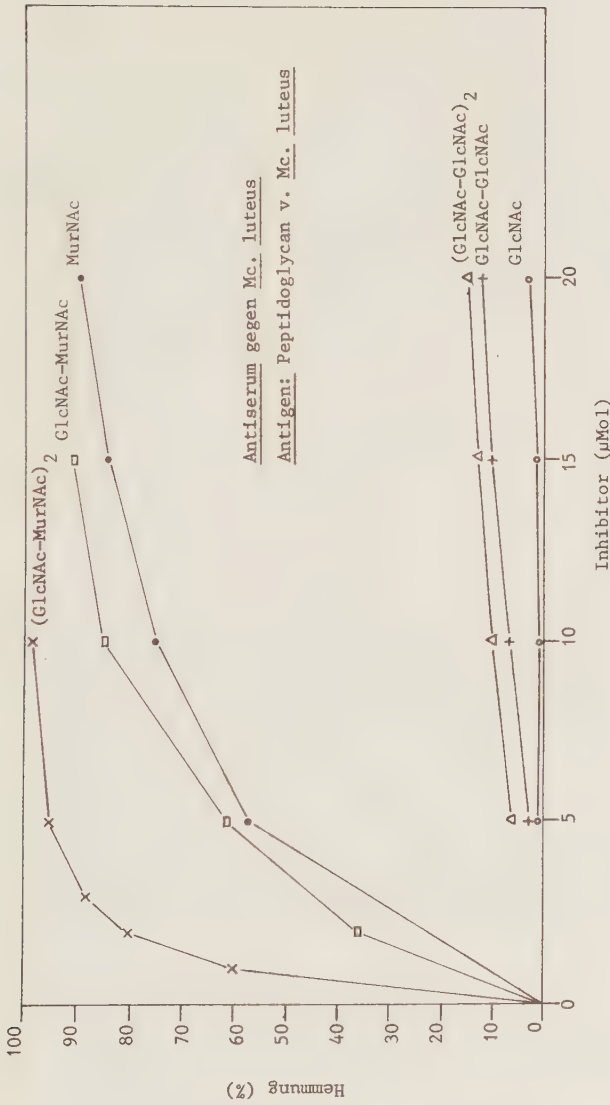


Abbildung 13. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Mc. luteus-Antiserum und Peptidoglycan von Mc. luteus

Acetyl-Chitobiose und N-Acetyl-Chitotetraose stark hemmen; die Hemmung nimmt vom Monomeren zum Tetrameren zu. N-Acetyl-Muraminsäure hemmt nur unbedeutend und die Oligosaccharide GlcNAc-MurNAc und GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc zeigen eine um den Faktor 2.3 bzw. 2.0 geringere Hemmwirkung als N-Acetyl-Chitobiose bzw. N-Acetyl-Chitotetraose (bei 50-prozentiger Hemmung). Das Ergebnis der vergleichenden Hemmung mit freier und Carboxyl-substituierter N-Acetyl-Muraminsäure (N-Acetyl-Muraminsäureäthylamid) zeigt auf, daß die geringe Hemmwirkung der Lactyl-Chitosaccharide im Vergleich zu den Chitosacchariden auf die freie Carboxylgruppe der Muraminsäure zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse beweisen, daß die Glycanstrang-Antikörper in den Streptococcus A-variant-Antiseren und die aus den Micrococcus luteus-Antiseren mit Chitin als Antigen bzw. mit Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis präzipitierbaren Antikörper identische Spezifität besitzen. Abbildung 12 zeigt nur die Präzipitations-Hemmung für Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, da wir mit den Peptidoglycanen von S. aureus, B. subtilis bzw. mit Chitin als Antigen sehr ähnliche Ergebnisse erhielten.

Neben diesen, spezifisch gegen N-Acetyl-Glucosamin als determinanten Zucker gerichteten Antikörpern, konnten wir aus den Micrococcus luteus-Antiseren mit Peptidoglycan von Mc. luteus oder Mc. lylae als Antigen noch eine weitere Antikörperpopulation präzipitieren. Diese Antikörper zeigen keine oder nur geringe Affinität zu N-Acetyl-Glucosamin, Acetyl-Chitobiose und Acetyl-Chitotetraose, sie sind dagegen hochspezifisch für N-Acetyl-Muraminsäure sowie für die Oligosaccharide GlcNAc-MurNAc und GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc. Die vergleichende Hemmung mit N-Acetyl-Muraminsäure und mit N-Acetyl-Muraminsäureäthylamid ergab die absolute Notwendigkeit einer freien, unsubstituierten Carboxylgruppe für die Bindung der Antikörper an das Antigen.

Diskussion

=====

Die vorliegende Arbeit ging von einer in der Literatur beschriebenen Kontroverse zur Spezifität der gegen den Glycanstrang des Peptidoglycans gerichteten Antikörper aus. Karakawa et al. (57,58) und Rolicka und Park (102) beschreiben N-Acetyl-Glucosamin als immunodominanten Zucker des Glycanstrangs des Peptidoglycans, während Wikler (167,168) N-Acetyl-Muraminsäure und nicht N-Acetyl-Glucosamin als antigene Determinante angibt.

Zur Klärung dieses Widerspruchs untersuchten wir die Präzipitationsreaktionen zwischen Antiseren gegen Streptococcus A-variant sowie gegen Micrococcus luteus und folgenden Antigenen:

- Peptidoglycane von Streptococcus A-variant, S. aureus, B. subtilis, Mc. luteus, Mc. lylae;
- Chitin

Die verwendeten Antiseren und Antigene erlaubten im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Arbeiten (57,58,102,167,168) erstmals die isolierte Untersuchung der "Anti-Glycanstrang-Präzipitation" ohne störenden Einfluß von Kreuzreaktionen und Nebenreaktionen.

In den früheren Arbeiten zur Spezifität der "Anti-Glycanstrang-Antikörper" wirkten sich vor allem folgende Reaktionen störend aus:

- 1.) Antikörper mit Spezifität gegen N-Acetyl-Glucosamin als immunodominanten Zucker des Zellwandpolysaccharids interferieren mit Peptidoglycan (57,58,102).
- 2.) Antikörper gegen das Zellwandpolysaccharid reagieren mit kovalent an Peptidoglycan gebundenem Polysaccharid (102).
- 3.) Interferenz von Antikörpern mit Spezifität gegen den Peptidteil

des Peptidoglycans (57,58,102,167,168).

Zu 1.) Die Zellwandpolysaccharide Gram-positiver Bakterien stellen potente Immunogene dar (33,63). Die zur Immunisierung ausgewählten Bakterien (mit Trypsin behandelte ganze Zellen von Streptococcus A-variant und Micrococcus luteus) enthalten in ihrer Zellwand außer im Peptidoglycan kein N-Acetyl-Glucosamin (Tabelle 15). Wir konnten somit eine Kreuzreaktion von Antikörpern, die gegen N-Acetyl-Glucosamin als immundominanten Zucker des Polysaccharids gerichtet sind (z.B. bei Streptococcus pyogenes A (102)) mit den N-Acetyl-Glucosamin-Molekülen des Glycanstranges ausschließen.

Tabelle 15. Zusammensetzung der Zellwandpolysaccharide und Zellwandteichonsäuren der zur Immunisierung bzw. als Antigene verwendeten Bakterienstämme; ¹⁾ Streptococcus A wurde nicht in die immunologischen Untersuchungen mit einbezogen; ²⁾ genaue Zusammensetzung des Zellwandpolysaccharids nicht bekannt;

<u>Streptococcus A</u> ¹⁾					
C-Polysaccharid	β-GlcNAc	-	Rham	-	-
<u>Streptococcus A-variant</u>					
C-Polysaccharid	-	-	Rham	-	-
<u>Micrococcus luteus</u>					
Polysaccharid	-	Glc	-	ManNUA	-
<u>Staphylococcus aureus</u>					
Teichonsäure	α-GlcNAc β-GlcNAc	-	-	-	Ribit
<u>Bacillus subtilis</u>					
Teichonsäure	-	Glc	-	-	Ribit
<u>Micrococcus lylae</u> ²⁾					
Polysaccharid	-		-		-

Zu 2.) Die Extraktion von Polysacchariden und Teichonsäuren aus tryptisch gereinigten Zellwänden erfolgte mit 10 %-iger Trichloressigsäure bei 60 °C für acht Stunden. Die Verwendung von Rohzellwänden als Antigene (102) wurde vermieden, ebenso die Formamidextraktion der Zellwände (57,58,167,168), da unter diesen Reaktionsbedingungen (30 Minuten, 150-180 °C) eine Formylierung von Aminogruppen und Hydroxylgruppen auftritt (42,96).

Die verwendeten Antiseren enthalten neben Antikörpern gegen Peptidoglycan Antikörper, die gegen das Glucose-Mannosaminurinsäure-Polysaccharid bei Micrococcus luteus (95) bzw. gegen das Rhamnose-Polysaccharid bei Streptococcus A-variant (73) gerichtet sind. Eine Kreuzreaktion dieser Antikörper mit Spuren von unvollständig extrahiertem Zucker-Polymer in der isolierten Peptidoglycanpräparation wäre denkbar. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Zellwandpolysaccharide (Tabelle 15, Seite 94) der ausgewählten Bakterien läßt in der heterologen Präzipitation eine Interferenz von Antikörpern gegen das Zellwandpolysaccharid jedoch nicht erwarten. Die etwa gleich starken homologen und heterologen Präzipitationsreaktionen sowie die hohe spezifische Hemmbarkeit der Präzipitationsreaktionen mit analogen Zuckern des Peptidoglycan-Glycanstranges erlaubten, selbst in der homologen Präzipitationsreaktion den störenden Einfluß von Antikörpern gegen die Zellwandpolysaccharide auszuschließen. Die gewählte Extraktionsmethode erweist sich somit als ausreichend.

Zu 3.) In Kaninchen erzeugte Peptidoglycan-Antiseren enthalten meist nur zu einem geringen Anteil Antikörper mit Spezifität gegen den Glycanstrang des Mureins. Der überwiegende Teil der gegen Peptidoglycan gebildeten Antikörper zeigt Spezifität für die Peptiduntereinheit mit C-terminalem D-Alanyl-D-Alanin (117,118,122,132,133, 167,168,171). Solche, gegen die Peptiduntereinheiten mit C-terminalem D-Alanyl-D-Alanin gebildeten Antikörper lassen sich aus den Antiseren mit dem synthetischen Protein-Peptid-Konjugat HSA-(CH₂CO-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)₃₄ quantitativ abtrennen (122), (vgl. Abbildung 14). Diese spezifische Absorption der gegen die Peptid-

untereinheit mit C-terminalem D-Alanyl-D-Alanin gerichteten Antikörper ermöglichte erstmals die isolierte Untersuchung der Spezifität der "Glycanstrang-Antikörper" ohne störende Interferenz von Antikörpern gegen den Peptidteil des Peptidoglycans. Alle früheren Untersuchungen (57,58,102,167,168) erfassten die gegen die Peptiduntereinheit als determinante Gruppe gerichteten Antikörper mit.

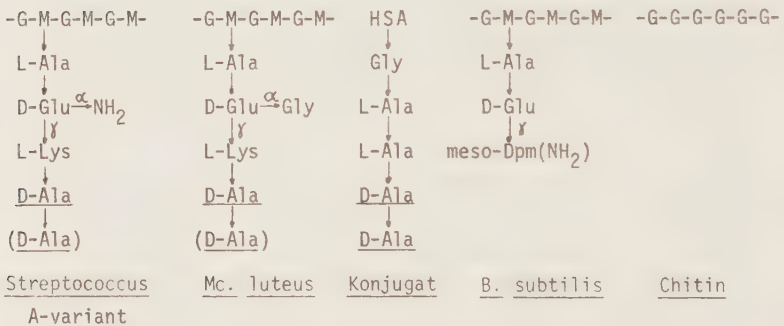


Abbildung 14. Schematische Darstellung der Strukturen von Chitin, dem Konjugat HSA-(CH₂CO-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)₃₄ sowie der Strukturen der Peptiduntereinheiten von Streptococcus A-variant, Micrococcus luteus und Bacillus subtilis

Ferner ermöglichte die Verwendung von Chitin und Bacillus subtilis Peptidoglycan als Antigene die isolierte Untersuchung der Glycanstrang-Präzipitation (vgl. Abb. 14). Im Peptidoglycan von Bacillus subtilis W23 fehlen Pentapeptide mit C-terminalem D-Alanyl-D-Alanin; auf Grund einer sehr starken Carboxypeptidaseaktivität liegen ca. 70 % der Peptiduntereinheiten nur als Tripeptide vor (37). In den Peptiduntereinheiten der zur Immunisierung verwendeten Bakterien kommt Lysin in Position 3 vor, während Bacillus subtilis als Diaminosäure meso-Diaminopimelinsäure im Peptidoglycan aufweist.

Die α -Carboxylgruppe der D-Glutaminsäure der Peptiduntereinheit ist bei Streptococcus A-variant amidiert und bei Micrococcus luteus mit Glycin substituiert, während sie bei Bacillus subtilis W23 unsubstituiert ist. Die Quervernetzung der Peptiduntereinheiten bei den zur Immunisierung verwendeten Bakterien und bei Bacillus subtilis unterscheidet sich ebenfalls.

Diese Unterschiede im Aufbau der Peptidoglycane lassen eine Interferenz von Antikörpern gegen den Peptidteil des Peptidoglycans als unwahrscheinlich erscheinen.

Mit Chitin als Antigen war auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit mit dem Zuckerstrang des Peptidoglycans eine Kreuzreaktion ausschließlich mit "Anti-Glycanstrang-Antikörpern" zu erwarten.

Die Untersuchung der Spezifität der "Anti-Glycanstrang-Antikörper" in den Antiseren gegen Streptococcus A-variant bestätigte die Ergebnisse von Rolicka und Park (102) sowie die von Karakawa et al. (57,58) und schien die Befunde von Wikler (167,168) zunächst zu widerlegen.

Alle eingesetzten Antigene ergaben mit den Streptococcus A-variant-Antiseren eine etwa gleich starke Präzipitation. Eine Kreuzreaktion mit Zellwand-Polysaccharid war, wie oben bereits diskutiert, nicht zu erwarten. Eine Interferenz von Antikörpern mit Spezifität gegen die Peptiduntereinheit des Peptidoglycans konnte, wie oben ausgeführt, durch die Verwendung absorbierter Seren sowie auf Grund der Primärstrukturen der verwendeten Antigene ebenfalls eliminiert werden. Die Präzipitationsreaktionen ließen sich weder mit dem Peptid L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala (Tetrapeptid der Peptiduntereinheit) noch mit L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala₂ (Peptiduntereinheit-Pentapeptid) hemmen. Ein Vergleich der Peptidoglycan-Primärstrukturen der zur Immunisierung verwendeten Bakterien und der Strukturen der eingesetzten Antigene (Abbildung 15, S. 98) ließ bereits vermuten, daß der Glycanstrang in allen verwendeten Antigenen die einzige gemeinsame antigene Determinante darstellt. Nach Ab-

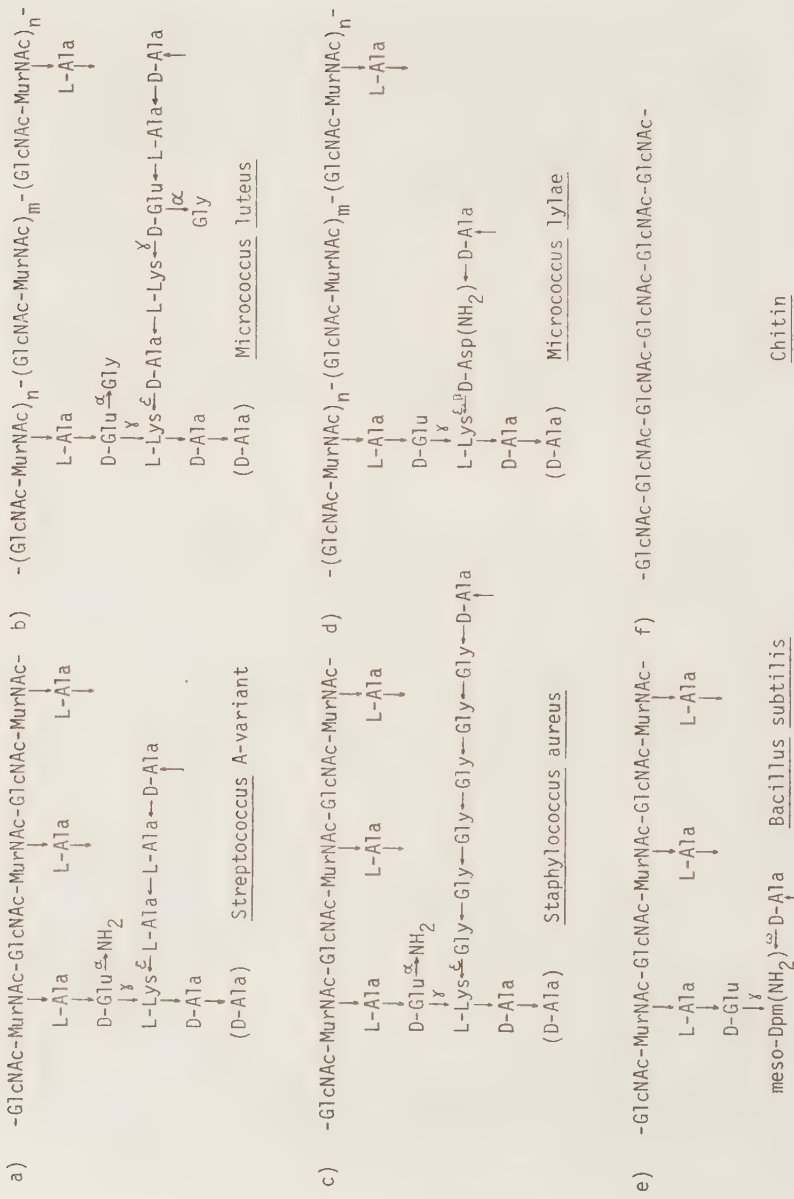
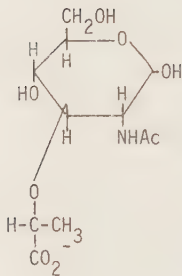


Abbildung 15. Ausschnitt aus der Primärstruktur der verwendeten Antigene. Bakterienzellen von Streptococcus A-variant und von Micrococcus luteus wurden zur Immunisierung verwendet.

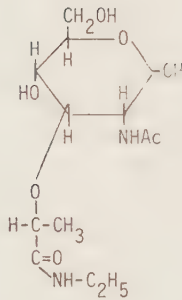
sorption der Seren an einem Antigen ließ sich mit keinem der eingesetzten Antigene noch weiteres Antikörperprotein präzipitieren. Dieses Ergebnis legte die Schlußfolgerung nahe, daß mit allen Antigenen, unabhängig von der Verschiedenheit ihrer chemischen Struktur, aus den Streptococcus A-variant-Antiseren Antikörperpopulationen sehr ähnlicher oder identischer Spezifität ausgefällt werden. Den endgültigen Beweis hierfür erbrachten die Hemmversuche der jeweiligen Präzipitationsreaktion. Mit allen eingesetzten Peptidoglycanen und mit Chitin als Antigen erhielten wir völlig identische Ergebnisse der Präzipitationshemmung. Dies zeigte an, daß die "Anti-Glycanstrang-Antikörper" in den Streptococcus A-variant-Antiseren gegen N-Acetyl-Glucosamin-Bausteine in β -1,4-glycosidischer Verknüpfung gerichtet sind und die Äther-Substitution der Hydroxylgruppe von C-3 jedes zweiten Acetyl-Glucosamins für die Bindung dieser Antikörper keine signifikante Rolle spielt. Der direkte Vergleich der Hemmwirkung von GlcNAc/MurNAc, von GlcNAc-GlcNAc/GlcNAc-MurNAc und von GlcNAc-GlcNAc-GlcNAc-GlcNAc/GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc zeigte den negativen Einfluß des Lactylrests auf die Bindung der Antikörper. Diese geringere Affinität von Lactyl-substituierten Chitosacchariden scheint jedoch nicht auf der Substitution an sich als sterischem Effekt zu beruhen, sondern eine Auswirkung der zusätzlich eingeführten negativen Ladung der Carboxylgruppe zu sein (vgl. Abbildung 16, S. 100).

Während N-Acetyl-Muraminsäure mit freier Carboxylgruppe keine Hemmwirkung aufwies, ließ sich die Präzipitation mit 20 μ M Muraminsäure-äthylamid/mg Antikörperprotein zu 16 % hemmen. Abbildung 16 zeigt die strukturelle Analogie zwischen N-Acetyl-Muraminsäure-äthylamid und einem Muraminsäure-Molekül, das mit einer Peptiduntereinheit substituiert ist, wie es im intakten Peptidoglycan die Regel darstellt. Diese Ergebnisse bestätigen eindeutig N-Acetyl-Glucosamin als determinanten Zucker des Glycanstranges.

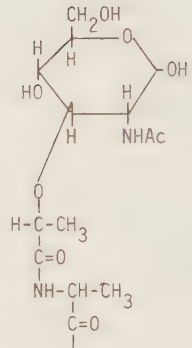
Die Größe des antigenen Bindungsbereiches scheint in der Größenordnung des Tetrasaccharids (Acetyl-Chitotetraose) zu liegen. Acetyl-Chitobiose hemmt fünf-fach besser als N-Acetyl-Glucosamin, während die weitere Kettenverlängerung vom Disaccharid zum Tetrasaccharid nur mehr eine



N-Acetyl-D-Muraminsäure



N-Acetyl-D-Muraminsäure-äthylamid



N-Acetyl-D-Muramyl-L-Alanyl-

Abbildung 16. Vergleich der Strukturen von N-Acetyl-Muraminsäure, N-Acetyl-Muraminsäure-äthylamid und von N-Acetyl-Muramyl-L-Alanyl-.

unwesentliche Steigerung der Hemmkapazität ergibt (1.3-fach).

Die Untersuchung an den Antiseren gegen Micrococcus luteus ergab unter Verwendung von Peptidoglycan von Staphylococcus aureus, Streptococcus A-variant, Bacillus subtilis sowie von Chitin als Antigen Ergebnisse, die sich mit den oben für die Streptococcus A-variant-Seren diskutierten als völlig identisch erwiesen. Präzipitierte man die Micrococcus luteus-Antiseren mit diesen Antigenen, erhielt man in allen Fällen eine etwa gleich starke Präzipitation. Diese Präzipitation ließ sich nur durch vorherige Absorption der Antiseren an Chitin sowie an den Peptidoglycanen von S. aureus, Streptococcus A-variant, B. subtilis, Mc. luteus und Mc. lylae vollständig hemmen. Die quantitative Präzipitations-

hemmung bewies die identische Spezifität dieser Antikörper und der "Glycanstrang-Antikörper" in den Antiseren gegen Streptococcus A-variant.

Somit enthalten die Streptococcus A-variant-Antiseren und die Antiseren gegen Micrococcus luteus eine Antikörper-Population, die gegen ein Tetrasaccharid aus β -1,4-glycosidisch verknüpften N-Acetyl-Glucosamineinheiten als antigene Determinante gerichtet ist, mit N-Acetyl-Glucosamin und nicht N-Acetyl-Muraminsäure als immunodominanter Gruppe. Wikler (167,168), der seine Untersuchungen ebenfalls an Antiseren gegen Mc. luteus durchführte, schien somit völlig widerlegt.

Eine Klärung brachte erst die Verwendung von Peptidoglycan von Micrococcus luteus oder Micrococcus lylae als Antigen. Die Ergebnisse der quantitativen Präzipitationsreaktionen sowie die der Absorptionsversuche deuteten bereits auf eine Antikörperpopulation mit Spezifität gegen eine weitere antigene Determinante des Peptidoglycans hin. Mit Peptidoglycan von Micrococcus luteus oder Micrococcus lylae als Antigen erhielten wir bei den Antiseren gegen Micrococcus luteus eine stärkere Präzipitation als mit Peptidoglycan von Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Streptococcus A-variant oder mit Chitin. Diese, mit Peptidoglycan von Micrococcus luteus oder Micrococcus lylae präzipitierbare Antikörperpopulation ließ sich aus den Antiseren nur mit diesen beiden Peptidoglycanen, nicht jedoch mit Peptidoglycan von Streptococcus A-variant, B. subtilis, S. aureus oder mit Chitin absorbieren. Die quantitative Präzipitations-Hemmungsreaktion bewies eindeutig die Spezifität dieser weiteren Antikörperpopulation für N-Acetyl-Muraminsäure und nicht für N-Acetyl-Glucosamin als determinanten Zucker. Eine freie, unsubstituierte Carboxylgruppe erwies sich für die Bindung dieser Antikörper als unbedingt notwendig. Freie N-Acetyl-Muraminsäure hemmte sehr stark, während N-Acetyl-Muraminsäure-äthylamid keinerlei Hemmwirkung aufwies.

Der Vergleich des chemischen Aufbaus der verwendeten Antigene (Abbildung 15, S. 98) erklärt das Zustandekommen der in der Literatur beschriebenen Kontroverse (57,58,102,167,168) und verdeutlicht die Beziehung zwischen Antigen-Struktur und Antikörper-Spezifität. Die Immu-

nisierung mit ganzen Zellen von Streptococcus A-variant führt zur Bildung von "Glycanstrang-Antikörpern", die gegen N-Acetyl-Glucosamin und nicht gegen N-Acetyl-Muraminsäure als immunodominanten Zucker gerichtet sind, da Streptokokken-Peptidoglycane ausschließlich Glycanstränge mit peptid-substituierter Muraminsäure besitzen. Peptidoglycan von Micrococcus luteus dagegen weist zwei antigene Determinanten auf, da längere Abschnitte peptid-substituierter Disaccharide mit unsubstituierten alternieren. Die Antikörperpopulation in den Antiseren gegen Micrococcus luteus, die gegen N-Acetyl-Glucosamin als immunodominanten Zucker gerichtet ist, bindet an Chitin oder an Peptidoglycane mit regelmäßiger Peptid-Substituierung der Glycanstränge (Streptococcus A-variant, B. subtilis, S. aureus). Die Antikörperpopulation mit Spezifität gegen freie, unsubstituierte Muraminsäure dagegen läßt sich nur mit Peptidoglycanen präzipitieren, die Muraminsäuremoleküle mit freier, nicht substituierter Carboxylgruppe aufweisen (Mc. luteus, Mc. lylae). Wikler führte seine Untersuchungen nur am homologen Präzipitationssystem Micrococcus luteus-Antiseren/Peptidoglycan von Micrococcus luteus durch und fand dadurch nur die gegen N-Acetyl-Muraminsäure, nicht jedoch die gegen N-Acetyl-Glucosamin als immunodominanten Zucker gerichteten Antikörper.

Neben der rein immunchemischen Charakterisierung des Glycanstranges des Peptidoglycans ergaben sich aus den vorliegenden Untersuchungen eine Reihe weiterer interessanter Aspekte.

Der Glycanstrang weist trotz der Uniformität im Aufbau einige Variationen wie O-Acetylierung (26) oder fehlende N-Acetylierung (6,26) auf. Bei Mycobacterium (2), Nocardia (32) und Micromonospora (157) findet sich N-Glycolyl-Muraminsäure anstelle von N-Acetyl-Muraminsäure. Unsere Untersuchungen lassen eine serologische Nachweismöglichkeit solcher Variationen im Glycanstrang des Peptidoglycans als gering erscheinen. Der Vergleich N-acetylierter und nicht N-acetylierter Antigene (Chitin und Chitosan sowie vollständig N-acetyliertes und partiell de-N-acety-

liertes Peptidoglycan von Bacillus subtilis) und die vergleichende Präzipitationshemmung mit N-acetylierten und nicht-N-acetylierten Inhibitoren (N-Acetyl-Glucosamin/Glucosamin sowie N-Acetyl-Muraminsäure/Muraminsäure) ergab nur einen geringen Einfluß der N-Acetylierung auf die Spezifität der "Glycanstrang-Antikörper" (Seidl und Schleifer, unveröffentlichte Ergebnisse). O-acetyliertes und de-O-acetyliertes Peptidoglycan verhielt sich in der Präzipitation ebenfalls einheitlich. Fehlende Peptidsubstituierung der Muraminsäure dagegen läßt sich, wie wir am Beispiel von Micrococcus luteus und Micrococcus lylae zeigen konnten, serologisch eindeutig und rasch feststellen.

In den letzten Jahren erschien eine Reihe von Arbeiten über die Anti-Tumorstoffwirkung des Peptidoglycans (13,36,74) sowie von niedermolekularen Muropeptiden (12,165). Arbeiten von Shier (137) stellten eine interessante Beziehung zwischen der Anti-Tumorstoffwirkung des Peptidoglycans und dem Glycanstrang her. Ein synthetisches Antigen, das N-Acetyl-Chitobiose als determinante Gruppe aufwies (N-Acetyl-Chitobiosyl-Poly-L-Asparaginsäure) zeigte wie Peptidoglycan oder wie isolierte Muropeptide ausgeprägte Schutzeffekte gegen maligne Tumore.

In Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist von besonderer Bedeutung, daß die gleiche strukturelle Einheit (β -1,4-glycosidisch verknüpfte Acetyl-Chitosaccharide) für die immunologische Spezifität des Glycanstranges und für die Anti-Tumorstoffwirkung des Peptidoglycans verantwortlich zu sein scheint.

Der Glycanstrang konnte in der vorliegenden Arbeit als eine Art "Common Antigen" charakterisiert werden. Er stellt das einzige gemeinsame Strukturelement der Peptidoglycane aller Bakterien dar. Der Nachweis von Antikörpern gegen den Glycanstrang erlaubt eine sichere Aussage über das Vorkommen von Peptidoglycan-Antikörpern in menschlichen oder tierischen Seren.

IV. Antikörper gegen synthetische Antigene mit strukturel-
=====
ler Ähnlichkeit zu den Interpeptidbrücken verschiedener
=====
Gram-positiver Kokken und ihre Anwendung in der Bakte-
=====
riendifferenzierung
=====

Problemstellung

Untersuchungen von Helgeland et al. (41) deuteten an, daß gegen die Interpeptidbrücken des Peptidoglycans spezifische Antikörper gebildet werden. Kaninchen immunisierte man mit ganzen, durch Formalin abgetöteten Zellen von Staphylococcus aureus. Die erhaltenen Antiseren unterwarf man der Immunaффinitätschromatographie an Pentaglycyl-Sepharose mit C-terminalem Glycin. Die so aus den Kaninchen-Hyperimmunseren isolierbaren Antikörper waren spezifisch gegen Glycinpeptide mit freier α -Carboxylgruppe gerichtet. Diese Glycinpeptide mit C-terminalem Glycin sind wahrscheinlich das Produkt einer Endopeptidase-Aktivität. Dieses Enzym spaltet Glycyl-Glycin-Bindungen in der Interpeptidbrücke des Staphylokokken-Peptidoglycans und findet sich bei Staphylokokken häufig (16,143,144,158-160).

Die Isolierung solcher "Interpeptidbrücken-Antikörper" aus Antiseren gegen ganze Bakterienzellen ist jedoch sehr arbeitsaufwendig. Darüber hinaus enthalten Kaninchen-Hyperimmunseren gegen ganze Zellen Antikörper gegen andere Zellwandpolymere und auch gegen den Glycanstrang oder

die Peptiduntereinheit des Peptidoglycans. Nur ein sehr kleiner Teil der Antikörper zeigt Spezifität gegen die Interpeptidbrücken. Aus diesem Grund erweist sich die Isolierung hochspezifischer "Interpeptidbrücken-Antikörper", die nicht mit anderen Zellwandantigenen kreuzreagieren, als äußerst schwierig.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb die Darstellung synthetischer Antigene versucht werden, die als determinante Gruppen Pentaglycinpeptide mit C-terminalem Glycin tragen. Durch Immunisierung von Kaninchen

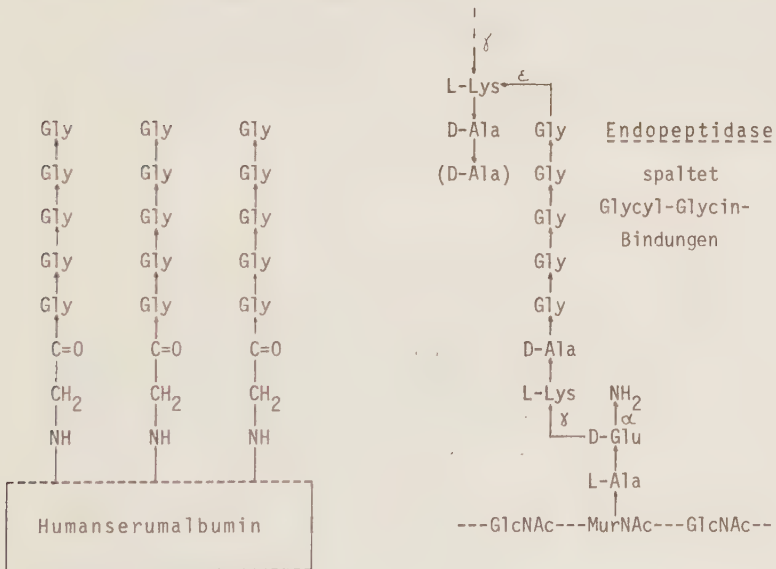


Abbildung 17. Schematische Darstellung des Konjugats HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ und eines Ausschnitts aus der Primärstruktur des Peptidoglycans von *Staphylococcus aureus* Copenhagen

mit diesen synthetischen Protein-Peptid-Antigenen sollen dann spezifische "Staphylokokken-Interpeptidbrücken-Antikörper" erhalten werden. In Abbildung 17, Seite 105, sind das synthetische Antigen $\text{HSA}-(\text{CH}_2\text{CO-Gly}_5)_{31}$ und ein Ausschnitt aus der Primärstruktur des Peptidoglycans von Staphylococcus aureus Copenhagen vergleichend gegenüber gestellt. Das synthetische Konjugat weist Glycinpeptide von einheitlicher Länge und Zusammensetzung mit freien Carboxylgruppen auf, da die Kopplung der Peptidketten an das Trägerprotein über ihre Aminogruppen erfolgte.

Die Reaktion der $\text{HSA}-(\text{CH}_2\text{CO-Gly}_5)_{31}$ -Antiseren mit Peptidoglycan und die Präzipitation zwischen Staphylococcus aureus-Antiseren und dem Konjugat $\text{HSA}-(\text{CH}_2\text{CO-Gly}_5)_{31}$ soll im folgenden untersucht werden. Die einzige Übereinstimmung in der Struktur der beiden Immunogene stellen Glycinpeptide mit C-terminalem Glycin dar.

Weiterhin soll in der vorliegenden Arbeit versucht werden, mit Hilfe synthetischer Antigene Antikörper zu erhalten, die spezifisch gegen den N-terminalen Bereich der Interpeptidbrückenpeptide gerichtet sind. Diese spezifischen Antiseren sollen dann eine serologische Differenzierung verschiedener Bakteriengattungen- und arten ermöglichen. Dies erscheint erfolgsversprechend, da, wie bereits oben angeführt, die Zusammensetzung und Sequenz der Interpeptidbrückenpeptide bei Gram-positiven Bakterien stark variiert und ein gattungs- oder artspezifisches Merkmal darstellt. Weiterhin ist in der Bakterienzellwand bei 15-70 % der Interpeptidbrückenpeptide die Quervernetzung zwischen D-Alanin in Position 4 der Peptiduntereinheit und der N-terminalen Aminosäure der Interpeptidbrücke einer benachbarten Peptiduntereinheit nicht ausgebildet. Mindestens 15 % der Interpeptidbrückenpeptide weisen also eine endständige freie α -Aminogruppe auf und sollten für eine Bindungsreaktion mit einem spezifischen Antikörper zugänglich sein.

In dieser Arbeit wurden deshalb die nachfolgend abgebildeten Antigene synthetisiert:

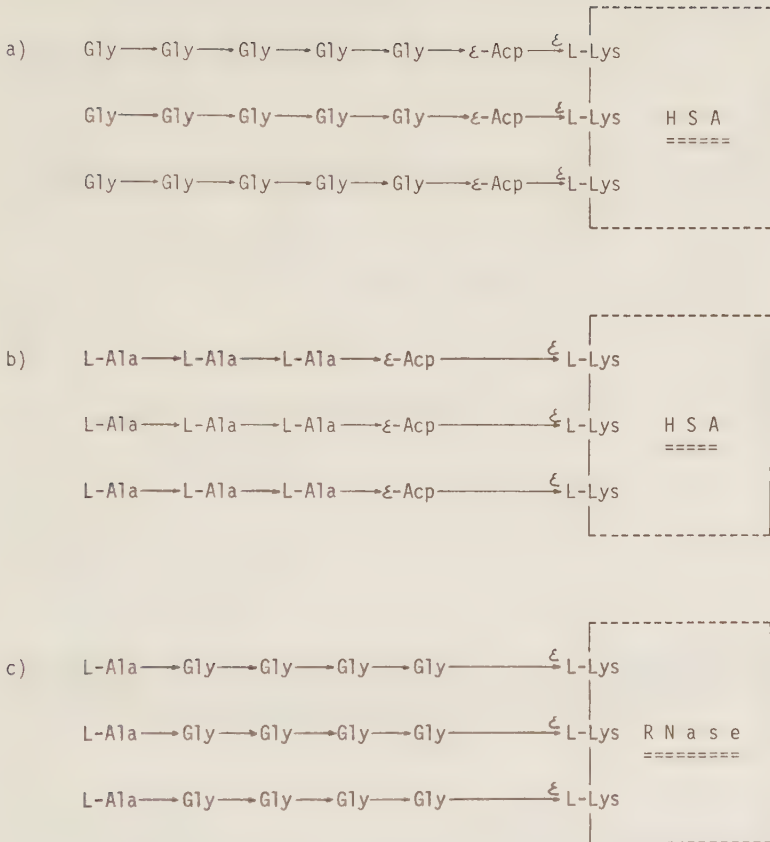


Abbildung 18. Schematische Darstellung der synthetischen Immunogene $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$, $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$

Die Peptidketten von einheitlicher Länge und Zusammensetzung weisen freie α -Aminogruppen auf, da die Kopplung an die Trägerproteine über

die C-Termini der Peptide erfolgte. Die in Abbildung 18 dargestellten synthetischen Immunogene tragen als determinante Gruppen Peptide, welche die Interpeptidbrücken von Staphylokokken und Mikrokokken bilden.

Die für die Gattung Staphylococcus charakteristischen Interpeptidbrücken zeigt Abbildung 19.

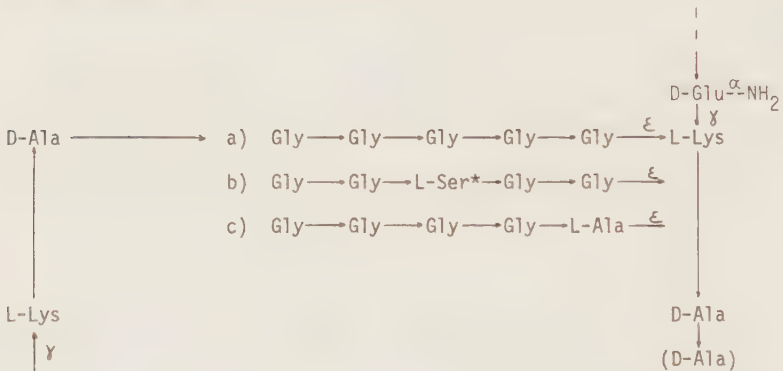


Abbildung 19. Schematische Darstellung der bei der Gattung Staphylococcus vorkommenden Interpeptidbrücken; * Position von L-Serin nicht festgelegt;

Peptidoglycane mit einem hohen Glycingehalt sind charakteristisch für Staphylokokken (7,116,150,153). In der Regel findet man drei bis sechs Mol Glycin/Mol Peptiduntereinheit. Bis heute unterscheidet man drei verschiedene bei Staphylokokken vorkommende Interpeptidbrücken (119), (Abbildung 19). Die meisten Staphylococcus aureus Stämme besitzen ein durch Penta- oder Hexaglycinbrücken quervernetztes Peptidoglycan (23, 116,152),(Abbildung 19). Das Peptidoglycan der meisten Staphylococcus epidermidis Stämme enthält ebenfalls Penta- oder Hexaglycin-Interpeptidbrücken, jedoch sind 0.5 bis 1.7 Mol Glycin/Mol Glutaminsäure durch

L-Serin ersetzt (Abbildung 19b). Bei einigen wenigen Stämmen (z.B. S. sciuri) findet man eine Tetraglycyl-L-Alanin-Interpeptidbrücke (62), (Abbildung 19c).

Übereinstimmend weisen jedoch alle Staphylokokken Oligoglycinpeptide mit N-terminalem Glycin auf, wie sie auch das in Abbildung 18a, Seite 107, dargestellte synthetische Antigen trägt.

Für viele Mikrokokken dagegen ist die folgende Quervernetzung typisch (119).

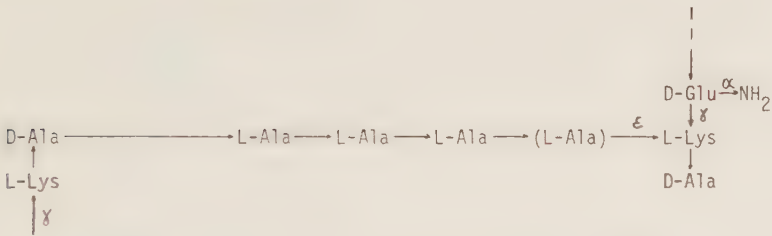


Abbildung 20. Schematische Darstellung der bei Mc. kristinae, Mc. roseus und Mc. varians vorkommenden Interpeptidbrücke

Mc. varians und Mc. roseus gehören zu den am weitest verbreiteten Mikrokokken und weisen, wie das in Abbildung 18b, Seite 107, dargestellte synthetische Antigen in der Interpeptidbrücke Tri-L-Alanin-Peptide auf, die mit ihrer Carboxylgruppe an die ϵ -Aminogruppe einer C₆-Monocarboxyl- ϵ -Aminosäure gebunden sind (L-Lysin im Peptidoglycan bzw. ϵ -Aminocaprinsäure als Lysin-Analogen in den synthetischen Immunogenen).

Durch Immunisierung von Kaninchen mit den in Abbildung 18a und 18b (Seite 107) dargestellten Antigenen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA und (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA sollte es nun möglich sein, Antiseren zu erhalten, die spe-

zifisch Oligoglycin- bzw. Oligo-L-Alanin-Peptide im Peptidoglycan binden. Diese "Anti-Staphylokokken-Seren" bzw. "Anti-Mikrokokken-Seren" sollten eine serologische Differenzierung der beiden Gattungen ermöglichen, da die determinanten Gruppen der synthetischen Antigene in ihrer Zusammensetzung und Sequenz vollständig den Interpeptidbrückenpeptiden entsprechen.

Zwei Stämme, die fälschlicherweise als Micrococcus roseus bezeichnet wurden ("Mc. roseus" CCM 168 und CCM 1405), besitzen die charakteristische Quervernetzung $N^6-(L-Ala-Gly_6)-L-Lys$. "Mc. roseus" CCM 168 und CCM 1405 weichen im GC-Verhältnis und in anderen Merkmalen von "echten" Mc. roseus Stämmen ab (64,119). Mit Hilfe von Antiseren gegen das synthetische Antigen $(L-Ala-Gly_4)_{11}$ -RNase (vgl. Abbildung 18c, Seite 107) soll untersucht werden, ob sich die Sequenzen Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, L-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly- und L-Ala-L-Ala-L-Ala serologisch unterscheiden lassen.

In der vorliegenden Arbeit sollen ferner spezifische Antikörper, die gegen verschiedene Determinanten der Peptiduntereinheit bzw. der Interpeptidbrückenpeptide gerichtet sind, mit Hilfe von synthetischen Antigenen, die entsprechende determinante Gruppen tragen, in Hyperimmunseren nachgewiesen werden. Die quantitative Präzipitationshemmung soll Aufschluß geben über die Spezifität dieser Antikörper.

Ergebnisse

=====

Spezifische Antikörper gegen Interpeptidbrückenpeptide mit

=====

freien Carboxylgruppen

=====

1. Synthese der Protein-Peptid-Konjugate mit Peptidketten mit freien

α -Carboxylgruppen

Die Einführung der Peptidketten in die Trägerproteine über die Amino-
gruppen erfolgte nach der Methode von Schechter et al. (109). Abbil-

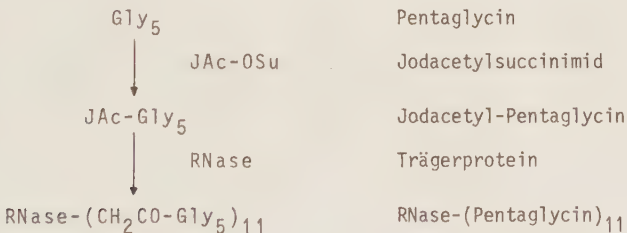


Abbildung 21. Schematische Darstellung der Synthese von RNase-(CH₂CO-Gly₅)₁₁

Abbildung 21 zeigt schematisch die Synthese solcher Protein-Peptid-Konjugate
am Beispiel von Ribonuclease-(Pentaglycin)₁₁.

Die Umsetzung der freien Peptide mit Jodacetylsuccinimidester führt zu

Formel des Konjugats	Molekulargewicht (berechnet)	Ausbeute bezogen auf eingesetztes Jodacetylpeptid	Substitution mM Peptid/mM Protein	
			a)	b)
HSA- $(\text{CH}_2\text{CO-Gly})_5$ ₃₁	79600	82 %	31.1	30.6
HC- $(\text{CH}_2\text{CO-Gly})_5$ ₂₇₁	3.093000	71 %	274.0	267.3
RNase- $(\text{CH}_2\text{CO-Gly})_5$ ₁₁	16800	73 %	10.3	12.2
HSA- $(\text{CH}_2\text{CO-L-Ala})_5$ ₃₅	83500	81 %	35.0	35.1
HC- $(\text{CH}_2\text{CO-L-Ala})_5$ ₂₉₀	3.120000	74 %	292.0	288.2
RNase- $(\text{CH}_2\text{CO-L-Ala})_5$ ₉	16700	75 %	8.3	10.0
HSA- $(\text{CH}_2\text{CO-Gly-L-Ala}_2\text{-D-Ala}_2)$ ₃₄	82600	81 %	34.0	34.1
HC- $(\text{CH}_2\text{CO-Gly-L-Ala}_2\text{-D-Ala}_2)$ ₂₄₀	3.100000	73 %	237.1	242.5
RNase- $(\text{CH}_2\text{CO-Gly-L-Ala}_2\text{-D-Ala}_2)$ ₈	16200	76 %	9.1	7.2

Tabelle 16. Analytische Daten der synthetisierten Protein-Peptid-Konjugate mit Peptidketten mit freier α -Carboxylgruppe;

- a) Bestimmung durch Vergleich der quantitativen Aminosäurezusammensetzung von Totalhydrolysaten der Proteine und der Protein-Peptid-Konjugate;
- b) direkte Bestimmung der in den Konjugaten substituierten Lysin- und Histidin-Moleküle mit der FDNB-Methode;

den entsprechenden Jodacetyl-Peptiden, die unter Ausbildung einer C-N-Kovalenz mit freien ϵ -Aminogruppen von Lysin und Imidazygruppen von Histidin der Trägerproteine reagieren. Die eingeführten Peptidketten von gleicher Länge und Zusammensetzung weisen freie α -Carboxylgruppen auf. Die analytischen Daten der synthetisierten Konjugate sind in Tabelle 16, Seite 112, zusammengefaßt.

2. Antiseren gegen HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁

2.1. Hämagglutination und quantitative Präzipitation der HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren mit verschiedenen Proteinen und synthetischen Antigenen

Die Immunisierung von Kaninchen mit HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ ergab nach fünf Wochen Antiseren mit Hämagglutinationstitern von 1:128 bis 1:1024 mit dem homologen Antigen (Abbildung 22, Seite 114). In den Präimmunseren ließen sich keine spezifischen Antikörper gegen HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ nachweisen. Abbildung 23, Seite 115, zeigt die Präzipitation der HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren mit einer Reihe Proteine und synthetischer Trägerprotein-Peptid-Konjugate.

Die homologe Präzipitation sowie die Reaktionen mit RNase-(CH₂CO-Gly₅)₁₁ und HC-(CH₂CO-Gly₅)₂₇₀ erwiesen sich als sehr stark. Mit dem Trägerprotein HSA dagegen lassen sich nur 22 % des Antikörperproteins der homologen Reaktion präzipitieren. RNase und Hämocyanin ergeben keinerlei Reaktion. Dieses Präzipitationsverhalten zeigt, daß ca. 80 % der gegen HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ gerichteten Antikörper Spezifität gegen die eingeführten Pentaglycinketten besitzen und die Kreuzreaktionen der Konjugate auf Pentaglycinpeptiden als gemeinsamer antigener Determinanten beruhen. Die Affinität der Antikörper bleibt beschränkt auf Glycinpeptide. Konjugate, die als determinante Gruppe Penta-L-Alanin-Peptide oder das Peptid Gly-L-Ala₂-D-Ala₂ (Peptid mit struktureller Ähnlichkeit im C-terminalem Bereich zum Pentapeptid der Peptidunter-

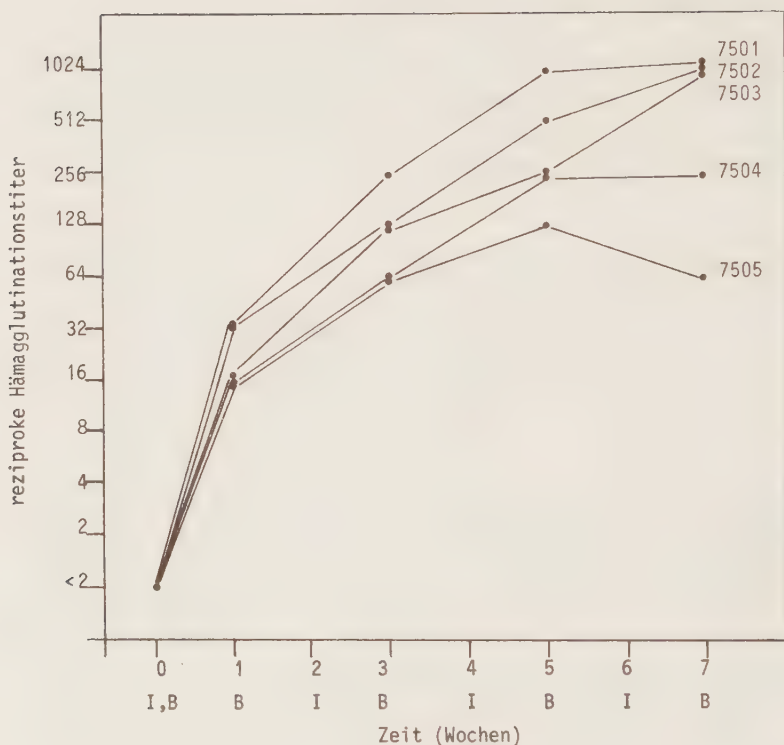


Abbildung 22. Passive Hämagglutination der Antiseren gegen HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ mit dem homologen Antigen. 7501-7505 = Bezeichnung der Kaninchen; I = Immunisierung; B = Blutentnahme;

einheit, L-Ala-γ-D-Glu-L-DA-D-Ala₂) tragen, reagieren nicht mit den HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren. Der Vergleich der Präzipitationen mit RNase-(CH₂CO-Gly₅)₁₁ (Pentaglycinpeptide mit freien α-Carboxylgruppen) und mit (Gly₅-ε-Acp)₁₀-RNase (Pentaglycinpeptide mit freien α-Amino-gruppen) beweist die Spezifität der Antikörper für Glycinpeptide mit freien C-Termini. Darüber hinaus bestätigt die Affinitätschromatogra-

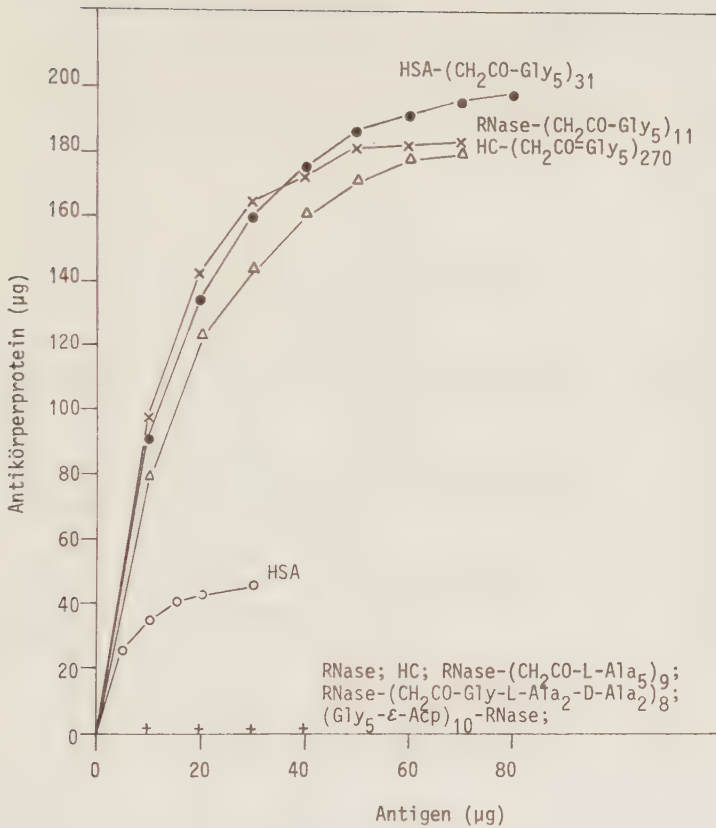


Abbildung 23. Quantitative Präzipitation zwischen HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren und (●) HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁; (x) RNase-(CH₂CO-Gly₅)₁₁; (Δ) HC-(CH₂CO-Gly₅)₂₇₀; (○) HSA; (+) RNase, HC, RNase-(CH₂CO-L-Ala₅)₉, RNase-(CH₂CO-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)₈ und (Gly₅-ε-Acp)₁₀-RNase ergaben keine Reaktion.

phie an Sepharose-(Pentaglycin)_n (Pentaglycinpeptide mit freien Carboxylgruppen als Liganden) die hohe Affinität der HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren für Glycinpeptide mit freien Carboxylgruppen. 47 % des in der homologen Reaktion ausfällbaren Antikörperproteins ließen sich mit Pentaglycin als Hapten wieder spezifisch desorbieren. Diese Antikörperfraktion soll nachfolgend "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" benannt werden.

2.2. Spezifität der "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper"

Die Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion soll die oben angedeutete Spezifität der HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren für Glycinpeptide mit freien C-Termini beweisen.

Proteolytische Enzyme in Seren können zum Abbau von Peptid-Inhibitoren während des Hemmtests führen und dadurch eine Verfälschung der Ergebnisse der Präzipitations-Hemmungsreaktion herbeiführen (107). Zur Überprüfung auf Proteasen in den Antiseren inkubierte man Antiserum und Pentaglycin unter den Reaktionsbedingungen des Hemmtests und prüfte dann papierchromatographisch auf Abbauprodukte von Pentaglycin. In den "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper"-Lösungen läßt sich im Gegensatz zu ungereinigtem Serum keine proteolytische Aktivität nachweisen.

Die Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ ist in Abbildung 24, Seite 117, dargestellt.

Aus den Hemmversuchen lassen sich die folgenden Ergebnisse ableiten:

- 1) Die HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren besitzen Spezifität gegen die an HSA gekoppelten Pentaglycinketten.

7 µM Pentaglycin oder Acetyl-Pentaglycin/mq Antikörper geben bereits eine 98%-ige Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen den "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁.

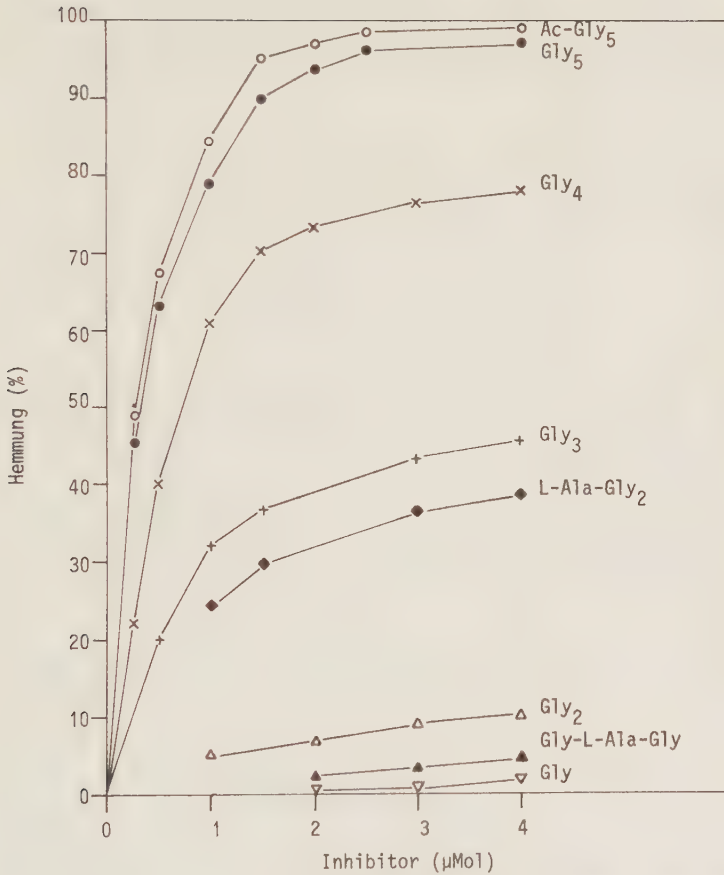


Abbildung 24. Quantitative Präzipitations-Hemmungsreaktion zwischen "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁; (o) Ac-Gly₅; (●) Gly₅; (x) Gly₄; (+) Gly₃; (◆) L-Ala-Gly₂; (Δ) Gly₂; (▲) Gly-L-Ala-Gly; (▽) Gly; keine Hemmung: Gly₅-OMe; L-Ala₅; L-Ala₃; D-Ala₃; L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala; L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂; Gly₂-L-Ala und Gly₂-L-Ser;

- 2) Die Antikörper sind gegen den C-terminalen Bereich der als determinante Gruppen eingeführten Pentaglycinpeptide gerichtet. Eine freie α -Carboxylgruppe erwies sich für die Bindung der Antikörper als unbedingt notwendig.

Freie und N-acetylierte Glycinpeptide ergeben starke Hemmungen der Präzipitationsreaktion, während die entsprechenden methylveresterten Glycinpeptide keinerlei Hemmung zeigen.

- 3) Oligo-L- und D-Alanin-Peptide sowie Peptide mit struktureller Ähnlichkeit zur Peptiduntereinheit des Peptidoglycans binden nicht an die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper".

Die Peptide Tri-L-Alanin, Penta-L-Alanin, Tri-D-Alanin, L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala und L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala₂ hemmen die Präzipitationsreaktion zwischen den "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ nicht. Somit bestätigt dieses Ergebnis die Schlußfolgerungen, die aus dem Ausbleiben einer Präzipitation der Antiseren mit RNase-(CH₂CO-L-Ala₅)₉ und mit RNase-(CH₂CO-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)₈ gezogen wurden.

- 4) C-terminales Glycyl-Glycin stellt die immunodominante Gruppe der antigenen Determinanten "Pentaglycin" dar.

Der Vergleich der Hemmwirkungen von Gly₂-L-Ala oder Gly₂-L-Ser mit den von L-Ala₂-Gly, L-Ser-Gly-Gly oder Gly-Gly-Gly zeigt die hohe Bedeutung von C-terminalem Glycin für die Bindung der Haptene an die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper". Peptide mit C-terminalem L-Alanin oder L-Serin anstelle von Glycin weisen keinerlei Hemmung auf.

Die an den C-Terminus anschließende Aminosäure hat auf die Affinität der Antikörper ebenfalls starken Einfluß. Dies beweist die vergleichende Hemmung mit Gly-Gly-Gly oder L-Ala-Gly-Gly und Gly-L-Ala-Gly oder L-Ala-L-Ala-Gly. Peptide mit der C-terminalen Sequenz Gly-Gly erweisen sich als Inhibitoren sehr viel wirksamer als Peptide

mit der C-terminalen Sequenz L-Ala-Gly. Dieser negative Einfluß des Austausches von Glycin gegen Alanin nimmt mit zunehmendem Abstand vom C-terminalem Ende ab (das Peptid L-Ala-Gly₂ hemmt nur wenig geringer als Triglycin).

2.3. Reaktion der "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" mit Peptido-

glycanen verschiedener Primärstruktur

2.3.1. Latex-Agglutination

Die Präzipitationsreaktion mit verschiedenen Proteinen und synthetischen Antigenen (vgl. 2.1.) und die Ergebnisse der quantitativen Präzipitations-Hemmung (vgl. 2.2.) beweisen die Spezifität der HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren für Oligoglycinpeptide mit freien C-Termini. Die Anwendbarkeit dieser Antiseren zum spezifischen Nachweis von Oligoglycin-Interpeptidbrücken in Peptidoglycanen sollte nun geprüft werden. Für einen schnellen empfindlichen Nachweis des Quervernetzungstyps arbeiteten wir einen Latex-Agglutinationstest aus. Die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" adsorbierte man an Latex-Partikel und bestimmte dann mit den einzelnen Peptidoglycanen die Agglutinationstiter. Der Test erwies sich als sehr empfindlich; die unterste Nachweisgrenze liegt für Staphylococcus aureus-Peptidoglycan bei 10 ng. In Tabelle 17, Seite 120, sind die Ergebnisse der Latex-Agglutination zusammengefaßt. Alle Staphylokokken-Peptidoglycane mit Penta- oder Hexaglycinbrücken und die meisten Peptidoglycane des N⁶-(Gly₄-L-Ser_{0.5}-1.5)-L-Lys-Typs ergeben im Agglutinationstest mit den "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" Titer von 1:256 bis 1:1024. Die Peptidoglycane von Staphylococcus haemolyticus und "Micrococcus roseus" CCM 168 dagegen agglutinieren nicht. Dieses Ergebnis überrascht zunächst, da Oligoglycinpeptide die Interpeptidbrücken der Peptidoglycane dieser beiden Bakterienstämme bilden. Während jedoch die Peptidoglycane, die hohe Titer in der Agglutination ergeben, zwischen 0.08 und 0.21 Mol C-terminales Glycin/Mol Glutaminsäure aufweisen, läßt sich in den Pepti-

Tabelle 17. Latex-Agglutination der "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" mit Peptidoglycanen verschiedener Primärstruktur

Bakterienstamm	Titer ¹⁾	Peptidoglycantyp	C-terminales Glycin (M/M Glu)
<i>S. aureus</i> H	1024	N ⁶ -(Gly _{5.1})-Lys (119)	0.21
<i>S. aureus</i> Copenhagen	1024	N ⁶ -(Gly _{4.3})-Lys (119)	0.16
<i>S. cohnii</i> DSM 20260	512	N ⁶ -(Gly _{5.0})-Lys (123)	0.12
<i>S. xylosum</i> DSM 20266	256	N ⁶ -(Gly _{5.4})-Lys (123)	0.07
<i>S. species</i> CCM 2495	512	N ⁶ -(Gly _{4.8} ,L-Ser _{0.5})-Lys (115)	0.18
<i>S. species</i> CCM 2574	512	N ⁶ -(Gly _{4.0} ,L-Ser _{1.0})-Lys (153)	0.17
<i>S. haemolyticus</i> DSM 20264	4	N ⁶ -(Gly _{3.7} ,L-Ser _{1.2})-Lys (123)	0.008
<i>S. hominis</i> JL 248	512	N ⁶ -(Gly _{4.0} ,L-Ser _{1.0})-Lys (61)	0.18
<i>S. warneri</i> ATCC 27836	256	N ⁶ -(Gly _{4.2} ,L-Ser _{0.8})-Lys (61)	0.08
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	256	N ⁶ -(Gly _{4.0} ,L-Ser _{1.0})-Lys (119)	0.09
" <i>Mc. roseus</i> " CCM 168	0	N ⁶ -(L-Ala-Gly ₆)-Lys (119)	0
<i>Mc. radiodurans</i>	64	N ⁵ -(Gly ₂)-Orn (116)	0.06
<i>Mc. luteus</i> CCM 169	32	N ⁶ -(L-Ala- γ -D-Glu ^{α} -Gly ₁ -Lys-D-Ala) ₁₋₃ -Lys (119)	1.0
<i>Mc. varians</i> CCM 418	0	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (60)	0
<i>Mc. roseus</i> CCM 1679	0	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (119)	0
<i>Mc. kristinae</i> ATCC 27570	0	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (60)	0
<i>Mc. agilis</i> CCM 2390	0	N ⁶ -(L-Ala ₃ -L-Thr)-Lys (119)	0
<i>Mc. lyallae</i> ATCC 27566	0	N ⁶ -(β -D-Asp(NH ₂))-Lys (60)	0
<i>Mc. nishinomiyaensis</i> JL 5	0	N ⁶ -(γ -D-Glu-L-Ser ₂)-Lys (65)	0
<i>Mc. sedentarius</i> CCM 314	0	vollständige Primärstruktur	0
<i>Mc. sedentarius</i> TW 93	0	unbekannt; Mur-L-Ala- γ -D-Glu-	0
<i>Mc. sedentarius</i> DM 51	0	L-Lys-D-Ala ₁₋₂ -PU; γ -Glu-Glu-	0
<i>Mc. sedentarius</i> BH 252	0	IP; N-terminal L-Ala und Glu; (60)	0
<i>B. subtilis</i> W23	0	meso-Dpm-direkt (163)	0
<i>Streptococcus A</i> -variant A486	0	N ⁶ -(L-Ala ₂₋₃)-Lys (122)	0
<i>Str. cremoris</i> 316a	0	N ⁶ -(L-Ala-L-Thr)-Lys (111)	0
<i>Mb. lacticum</i> IMRU 630	0	D-Glu ^{α} (Gly-L-Lys)- γ -L-Lys 2) (112,114)	0

1) reziproke Agglutinationstiter;

2) Quervernetzungstyp B; Quervernetzung zwischen D-Glutaminsäure in Position 2 und D-Alanin in Position 4' einer benachbarten Peptiduntereinheit;

doglycanen von Staphylococcus haemolyticus und "Micrococcus roseus" CCM 168 kein C-terminales Glycin feststellen. Somit bestätigt das Ausbleiben einer Agglutination mit diesen beiden Peptidoglycanen die hohe Spezifität der "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" für Glycinpeptide mit freier α -Carboxylgruppe.

In Übereinstimmung mit der Struktur ihrer Peptidoglycane erhalten wir mit Micrococcus radiodurans und Micrococcus luteus nur schwache Agglutinationsreaktionen. Mc. radiodurans besitzt Diglycine als Interpeptidbrücken und im Peptidoglycan von Mc. luteus weist die α -Carboxylgruppe der D-Glutaminsäure Substitution mit C-terminalem Glycin auf.

Für die hohe Spezifität der "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" kann als weiterer Beweis gelten, daß Peptidoglycane ohne Glycinpeptide als Interpeptidbrücken keinerlei Agglutination ergeben.

2.3.2. Quantitative Präzipitationsreaktion

- - - - -

Die Ergebnisse der quantitativen Präzipitationsreaktionen zwischen den "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und Peptidoglycanen verschiedener Primärstrukturen (Abbildung 25, Seite 122) stimmen vollkommen mit den Daten aus der Latex-Agglutination (Tabelle 17, Seite 120) überein.

Die Präzipitationskurven für Staphylococcus cohnii, Staphylococcus species CCM 2495, Staphylococcus species CCM 2574 und Staphylococcus hominis ähneln einander sehr. Die Peptidoglycane von Staphylococcus warneri, Staphylococcus epidermidis und Staphylococcus xylosus zeigen ein nahezu identisches Präzipitationsverhalten. Die Mengen an präzipitierbaren Antikörpern korrelieren annähernd mit dem molaren Gehalt an C-terminalem Glycin. Diese Beziehung wurde in der Agglutinationsreaktion bereits angedeutet und kommt in der quantitativen Präzipitation klar zum Ausdruck. Die Substitution von Glycin durch L-Serin in der Interpeptidbrücke wirkt sich auf das Präzipitationsverhalten negativ

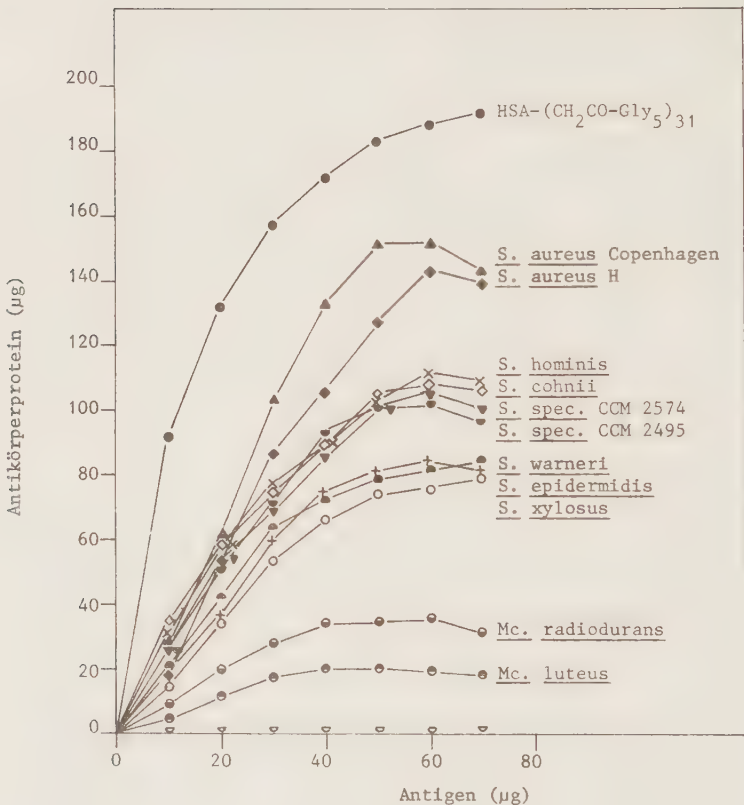


Abbildung 25. Quantitative Präzipitationsreaktion zwischen "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und (●) HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁; sowie (▲) Peptidoglycanen von S. aureus Copenhagen; (◆) S. aureus H; (x) S. hominis; (◇) S. cohnii; (▼) S. spec. CCM 2495; (♣) S. spec. CCM 2574; (♠) S. warneri; (o) S. epidermidis; (+) S. xyloso; (◐) Mc. radiodurans; (◑) Mc. luteus; (◒) S. haemolyticus, "Mc. roseus" CCM 168; Mc. varians, Mc. lylae, B. subtilis.

aus. Die Werte für C-terminales Glycin weisen in den Peptidoglycanen von Staphylococcus species CCM 2495, Staphylococcus species 2574 und Staphylococcus hominis ähnliche Größenordnungen auf wie bei Staphylococcus aureus-Peptidoglycan, dennoch ergeben die Peptidoglycane des $N^6-(\text{Gly}_4, \text{L-Ser}_{0.5-1.5})\text{-Lys}$ -Quervernetzungsstyps deutlich geringere Präzipitationen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Latex-Agglutination und den Primärstrukturen der Peptidoglycane präzipitieren Micrococcus luteus und Micrococcus radiodurans nur schwach.

Die Peptidoglycane von Staphylococcus haemolyticus und "Micrococcus roseus" CCM 168 reagieren nicht mit den "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern", da in diesen Peptidoglycanen keine Glycinpeptide mit freien Carboxylgruppen für eine Bindung der Antikörper an das Antigen zur Verfügung stehen.

Für die erneute Bestätigung der Spezifität der "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" erweist sich von besonderer Bedeutung, daß wir mit Peptidoglycanen ohne Oligoglycin-Interpeptidbrücken keine Präzipitationen erhalten.

2.4. Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktionen zwischen "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und Peptidoglycan von Staphylococcus aureus H

Die Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen den "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und Peptidoglycan von Staphylococcus aureus H ($N^6-(\text{Gly}_{5.1})\text{-Lys}$ -Interpeptidbrücke) bestätigt erneut die Spezifität der gegen $\text{HSA}-(\text{CH}_2\text{CO-Gly}_5)_{31}$ gebildeten Antikörper für Glycinpeptide mit C-terminalem Glycin (Abbildung 26, Seite 124). Die Ergebnisse ähneln sehr denjenigen, die wir für die Hapten-Hemmung der Präzipitation zwischen "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und $\text{HSA}-(\text{CH}_2\text{CO-Gly}_5)_{31}$ erhielten. Di-, Tri-, Tetra- und Pentaglycin erwiesen sich als starke Inhibitoren, während die Peptide Penta-L-Alanin, L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala und L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala₂ keinerlei Hemmwirkung zeigten.

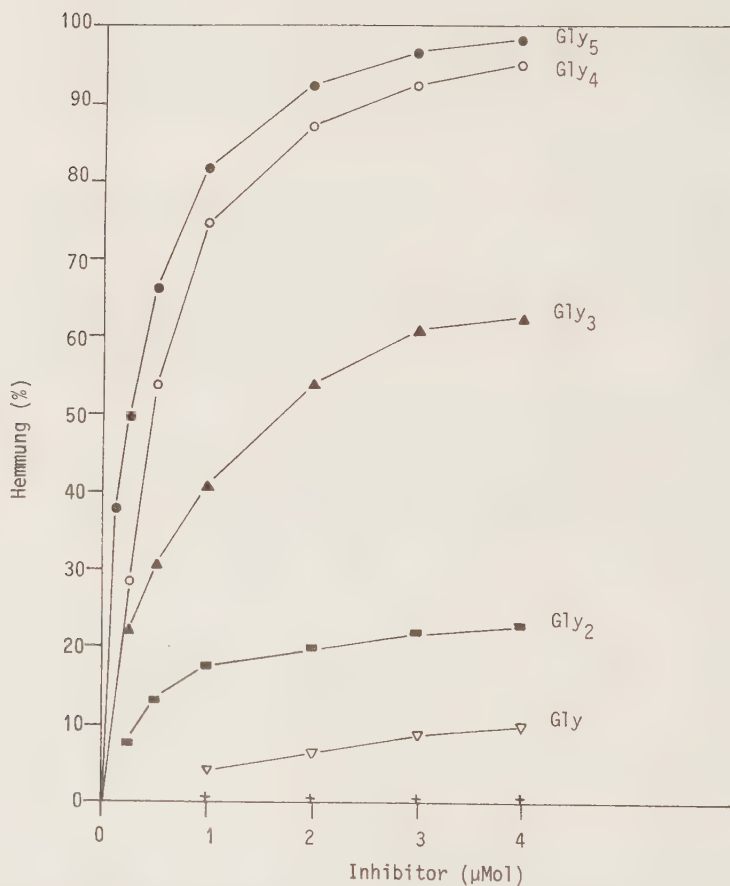


Abbildung 26. Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und Peptidoglycan von *Staphylococcus aureus* H. (▽) Gly; (■) Gly₂; (▲) Gly₃; (○) Gly₄; (●) Gly₅; (+) keine Hemmung: L-Ala₅; L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala; L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂; Gly₄-L-Ala; Gly₅-OMe;

Die vergleichende Hemmung mit Gly₂-L-Ala/Gly₃ und mit Gly₅/Gly₅-OMe beweist erneut, daß die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" nur an Glycinpeptide mit freiem C-terminalem Glycin binden.

3. Antikörper gegen die Pentaglycin-Interpeptidbrücken in Hyperimmun-
seren gegen Staphylococcus aureus

In Zusammenarbeit mit A. Grov, Norwegen (31) konnten wir unter Verwendung des synthetischen Antigens HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ bestätigen, daß Hyperimmunseren gegen Staphylococcus aureus Antikörper mit Spezifität gegen Glycin-Interpeptidbrückenpeptide mit freien Carboxylgruppen enthalten. Diese Glycinpeptide mit freien C-Termini entstehen wahrscheinlich durch Endopeptidase-Aktivität (16,143,144,158-160).

Tannierte Schafserthrozyten, die mit HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ beladen wurden, agglutinieren stark mit Hyperimmunseren gegen Staphylococcus aureus Stamm Cowan I, während mit HSA beladene Erythrozyten keine Reaktion ergeben.

Die Affinitätschromatographie der Staphylococcus aureus-Antiseren an Peptid-substituierten Sepharosen erlaubt die Auftrennung verschiedener Antikörperfraktionen mit definierter Spezifität:

- Fraktion Sepharose-(Gly₅)_n:

Antikörperpopulation, die sich durch Adsorption der Staphylococcus aureus-Antiseren an Pentaglycyl-Sepharose mit C-terminalem Glycin und anschließender Desorption isolieren läßt;

- Fraktionen Sepharose-(Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)_n; Sepharose-(L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala)_n;
Sepharose-(L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂)_n

Antikörperpopulationen mit Spezifität gegen die C-terminalen Berei-

che der an Sepharose gekoppelten Peptide L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala, L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala₂ und Gly-L-Ala₂-D-Ala₂;

Das Agglutinationsverhalten dieser isolierten Antikörperpopulationen ist zusammenfassend in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18. Agglutination von tannierten Schafterythrozyten, die mit HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ beladen wurden.

Antiserum	TSE-Agglutination
Antiserum gegen <u>Staphylococcus aureus</u> Cowan I	++++
Fraktion Sepharose-(Gly ₅) _n	++++
Fraktion Sepharose-(L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala) _n	-
Fraktion Sepharose-(L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala ₂) _n	-
Fraktion Sepharose-(Gly-L-Ala ₂ -D-Ala ₂) _n	-

Die Agglutination läßt sich mit Penta-, Tetra- und Triglycin, mit Acetyltri- oder pentaglycin und mit L-Ala-Gly₂, nicht jedoch mit Penta- oder Triglycinmethylester, Penta-L-Alanin oder Gly₂-L-Ala hemmen.

Die Ergebnisse der Agglutinationsreaktionen und der Agglutinations-Hemmungsreaktionen beweisen somit eindeutig, daß sich die Reaktion zwischen Staphylococcus aureus-Antiseren und HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ ebenso wie die Präzipitation der HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren mit Staphylococcus aureus-Peptidoglycan auf Glycinpeptide mit freien C-Termini als gemeinsamer antigener Determinanten zurückführen lassen.

Spezifische Antikörper gegen Interpeptidbrückenpeptide mit
=====

freien Aminogruppen

=====

1. Synthese der Peptidyl-Proteine mit Peptidketten mit freien α -Amino-

gruppen

Aus Tabelle 19, Seite 129, können die analytischen Daten der Peptidyl-Proteine entnommen werden. Abbildung 27, Seite 128, zeigt schematisch die Synthese der Peptidyl-Proteine mit freien α -Aminogruppen der eingeführten Peptidketten.

Erläuterungen zu Abbildung 27 (umseitig):

- a) Durch Umsetzung von Triglycin mit Benzyloxycarbonyl-Glycinsuccinimidester (Aminogruppe des Glycins geschützt durch den Benzyloxycarbonylrest, Carboxylgruppe über die energiereiche Succinimidesterbindung aktiviert) erhält man N-blockiertes Tetraglycin.
- b) Die "Aktivierung" der Carboxylgruppen von Benzyloxycarbonyl-Tetraglycin bzw. von Benzyloxycarbonyl-Di-L-Alanin erfolgt durch Veresterung der N-geschützten Peptide mit N-Hydroxysuccinimid.
- c) Diese "Aktivester" reagieren glatt mit ϵ -Aminocapronsäure unter Ausbildung einer Peptidbindung.
- d) Die Hydrierung der Benzyloxycarbonyl-Peptide mit Palladium-Aktivkohle als Katalysator ergibt unter Abspaltung der Aminoschutzgruppe die freien Peptide.
- e) Die Reaktion der freien Peptide mit o-Nitrophenylsulphenyl-L-Alaninsuccinimidester bzw. mit o-Nitrophenylsulphenyl-Glycinsuccinimidester führt zu den NPS-Derivaten der Peptide Pentaglycyl- ϵ -Aminocapronsäure, Tri-L-Alanyl- ϵ -Aminocapronsäure und L-Alanyl-Tetraglycin.

Abbildung 27. Schema der Synthese der Peptidyl-Proteine $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{10}\text{-RNase}$, $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{11}\text{-RNase}$ und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$

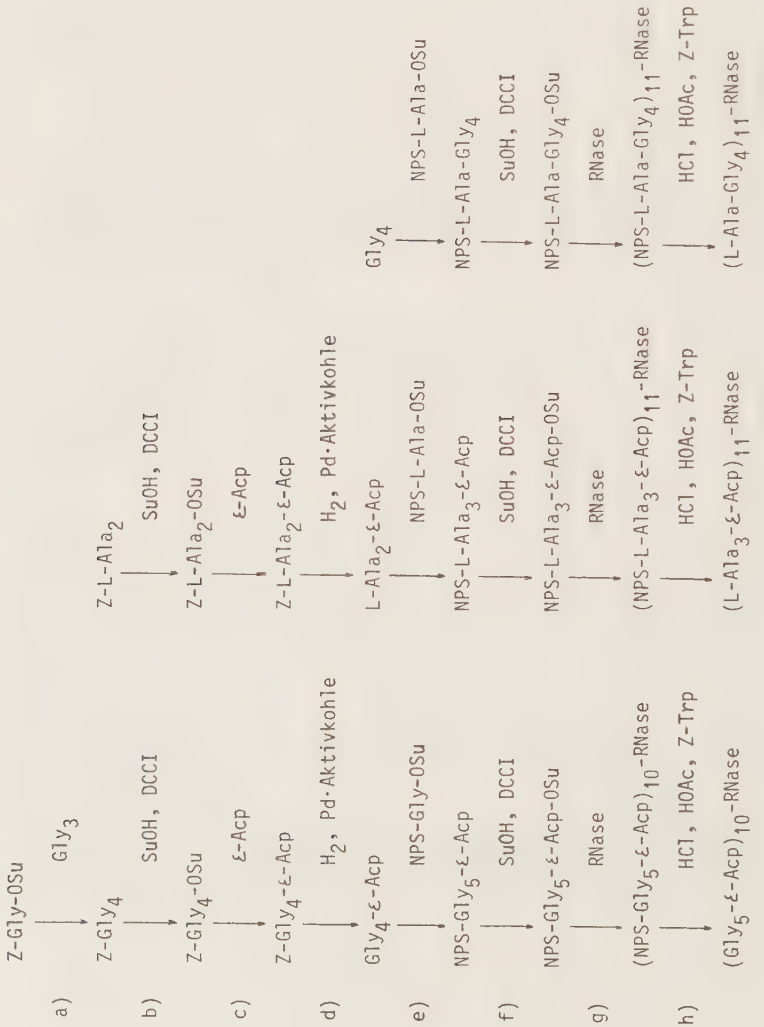


Tabelle 19. Analytische Daten der synthetisierten Peptidyl-Proteine

Formel des Peptidyl-Proteins	Überschuß an *		mM Überschuß an		Peptidsubstituierung +) Aminosäureanalyse Mol Peptid/Mol Protein
	Ala	Gly (mM/mM Protein)	ε-Acp	Gly/ε-Acp Ala/ε-Acp Gly/Ala	
(Gly ₅ -ε-Acp) ₁₀ -RNase	-	49.9	9.9	5.0	10.2
(Gly ₅ -ε-Acp) ₂₀ -HSA	-	103.8	20.4	5.1	20.6
(L-Ala ₃ -ε-Acp) ₁₁ -RNase	33.1	-	11.2	-	11.1
(L-Ala ₃ -ε-Acp) ₂₂ -HSA	66.3	-	21.9	-	22.0
(L-Ala-Gly ₄) ₁₁ -RNase	11.0	44.1	-	-	11.0
				4.0	11.4

*) berechnet aus der quantitativen Aminosäurezusammensetzung. RNase enthält 12 Mol Alanin/Mol Protein und HSA 52 Mol Alanin/Mol Protein. ε-Aminocapronsäure findet sich nicht in Proteinen.

+)
Durchschnittswert aus dem Überschuß an Alanin, dividiert durch 3 (drei Alaninmoleküle/Peptidkette), und dem Überschuß an ε-Aminocapronsäure bzw. Durchschnittswert aus dem Überschuß an Glycin, dividiert durch 5 (fünf Glycinmoleküle/Peptidkette), und dem Überschuß an ε-Aminocapronsäure bzw. Durchschnittswert aus dem Überschuß an Glycin, dividiert durch 4 (vier Glycinmoleküle/Peptidkette), und dem Überschuß an Alanin.

°)
Die Peptidyl-Proteine behandelte man mit NaNO₂/HOAc und bestimmte anschließend den Lysingehalt der Proben. Lysinmoleküle, die nicht mit Peptiden substituiert sind, werden nicht desaminiert. Die Methode erlaubt dadurch eine direkte Bestimmung der substituierten Lysinmoleküle im Trägerprotein.

- f) Nach Aktivierung der Carboxylgruppen der NPS-Peptide durch Succinimidveresterung lassen sich die N-geschützten Peptidketten mit den C-Termini an freie ϵ -Aminogruppen des Lysins in den Trägerproteinen binden.
- h) Die hohe Säurelabilität der NPS-Schutzgruppe erlaubt die schonende selektive Entfernung ohne Nebenreaktionen in den Trägerproteinen. Dem Reaktionsgemisch setzte man zum Abfangen des entstehenden NPS-chlorids Benzyloxycarbonyl-Tryptophan im Überschuß zu und verhinderte dadurch eine Reaktion des NPS-chlorids mit Tryptophan und Cysteinmolekülen der Trägerproteine.

Die synthetischen Peptidyl-Proteine weisen Peptidketten gleicher Größe und Zusammensetzung mit freien N-Termini auf.

2. Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA, (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA und (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase

2.1. Passive Hämagglutination und Kapillarpräzipitation

Der zeitliche Verlauf der Immunisierung der Kaninchen mit (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA, (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA und (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase ist in Abbildung 28, Seite 131, dargestellt. Nach neun Wochen Immunisierung hatten die Titer ausreichende Werte erreicht (1:128 bis 1:1024); die Tiere wurden entblutet. Die Präimmunseren wiesen keine Antikörper gegen die synthetischen Peptidyl-Proteine auf.

Die Kapillarpräzipitation zwischen Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine mit Peptidketten mit freien α -Aminogruppen und verschiedenen Antigenen zeigt Tabelle 20, Seite 132. Antiseren gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA ergeben in der homologen Präzipitation eine 4+ Reaktion und eine 3+ Reaktion mit (Gly₅- ϵ -Acp)₁₀-RNase. Das Trägerprotein präzipitiert nur schwach, RNase als Antigen zeigt keine Reaktion. Aus dem Präzipitationsverhalten läßt sich schließen, daß die gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA gebildeten Antikörper vor allem gegen die eingeführten Pentaglycinketten

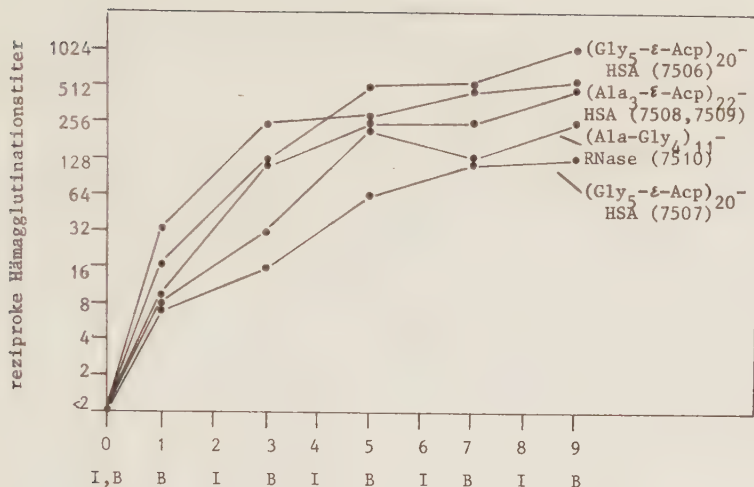


Abbildung 28. Passive Hämagglutination der Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA, (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA und (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase mit den jeweiligen homologen Antigenen. 7506-7510 = Bezeichnung der Kaninchen; I = Immunisierung; B = Blutentnahme;

gerichtet sind und nur ein kleiner Teil des in der homologen Reaktion präzipitierbaren Antikörperproteins Spezifität für das Trägerprotein HSA besitzt.

Von besonderer Wichtigkeit für die Spezifität der (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA-Antiseren und ihre Anwendung zur Peptidoglycantyp-Differenzierung erweist sich das Ausbleiben einer Reaktion mit den Antigenen (L-Ala₃-ε-Acp)₁₁-RNase und (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase. Die antigenen Determinanten Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-ε-Acp- und L-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly- unterscheiden sich in ihrem N-terminalen Bereich nur durch den Ersatz eines Glycins

Tabelle 20. Kapillarpräzipitation zwischen Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine mit Peptidketten mit freien N-Termini und verschiedenen Proteinen und synthetischen Antigenen. * Kreuzreaktion mit Trägerprotein;

<u>Antigen</u>	<u>Präzipitation mit Antiseren gegen</u>			
	(Gly ₅ - ϵ -Acp) ₂₀ ⁻ HSA	(L-Ala ₃ - ϵ -Acp) ₂₂ ⁻ HSA	(L-Ala-Gly ₄) ₁₁ ⁻ RNase	(L-Ala-Gly ₄) ₁₁ ⁻ RNase, adsorbiert an RNase
(Gly ₅ - ϵ -Acp) ₂₀ ⁻ -HSA	++++ *	+	-	-
(Gly ₅ - ϵ -Acp) ₁₀ ⁻ -RNase	+++	-	+	-
HSA	+	+	-	-
RNase	-	-	+	-
(L-Ala ₃ - ϵ -Acp) ₁₁ ⁻ -RNase	-	+++	++	+
(L-Ala-Gly ₄) ₁₁ ⁻ -RNase	-	+	++++ *	+++
RNase-(CH ₂ CO-L-Ala ₅) ₉	-	-	+	-
RNase-(CH ₂ CO-Gly ₅) ₁₁	-	-	+	-
RNase-(CH ₂ CO-Gly-L-Ala ₂ -D-Ala ₂) ₈	-	-	+	-

durch ein L-Alanin. Dennoch zeigen Antikörper mit Spezifität gegen Peptidketten der Sequenz Gly₅- ϵ -Acp- weder Affinität für Peptide der Sequenz L-Ala-Gly₄- noch für L-Ala₃- ϵ -Acp-.

Analoge Ergebnisse erhalten wir für die gegen (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA gebildeten Antikörper. Aus dem Präzipitationsverhalten läßt sich ableiten, daß die (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA-Antiseren hochspezifisch gegen Tri-L-Alanin-Peptide gerichtet sind und an Oligo-Glycinpeptide nicht binden. Die schwache Reaktion von (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA-Antiseren mit (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA beruht auf Antikörpern gegen das Trägerprotein HSA. (Gly₅- ϵ -Acp)₁₀-RNase gibt im Gegensatz zu (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA mit den (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA-Antiseren keine Reaktion, und nach Adsorption der (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA-Antiseren an HSA fällt die Kreuzreaktion mit (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA ebenfalls negativ aus.

Die Antiseren mit Spezifität gegen die Sequenz L-Ala₃- ϵ -Acp- präzipitieren mit dem Antigen (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase nur schwach. Vermutlich beruht diese Kreuzreaktion auf gemeinsamem N-terminalem L-Alanin in den Peptidketten der Antigene (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA und (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase.

Dieses Ergebnis demonstriert wiederum die hohe Spezifität von Antikörpern.

Oberzeugend wird die Fähigkeit von Antikörpern, geringste strukturelle Unterschiede in der immunologischen Reaktion aufzudecken, durch das Präzipitationsverhalten von Antiseren gegen (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase demonstriert. Die Antiseren mit Spezifität gegen die Sequenz L-Ala-Gly₄- (zur Abtrennung von Antikörpern gegen das Trägerprotein an RNase adsorbiert) geben eine 3+ Reaktion in der homologen Präzipitation, sie präzipitieren dagegen nur schwach mit einem Antigen, das L-Ala₃- ϵ -Acp- als determinante Gruppe trägt. Peptide der Sequenz Gly₅- ϵ -Acp- dagegen binden nicht! Somit läßt sich der N-terminale Austausch zweier Aminosäuren, die sich nur durch eine Methylgruppe voneinander unterscheiden (Glycin und L-Alanin), serologisch eindeutig nachweisen.

Synthetische Antigene mit Peptid-Determinanten mit freien Carboxylgruppen ($\text{RNase-(CH}_2\text{CO-L-Ala}_5)_9$; $\text{RNase-(CH}_2\text{CO-Gly}_5)_9$; $\text{RNase-(CH}_2\text{CO-Gly-L-Ala}_2\text{-D-Ala}_2)_8$) besitzen keinerlei Affinität für Antikörper gegen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$, $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ oder gegen $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$. Dies deutet an, daß die gegen die Konjugate mit N-terminalen Peptidketten gerichteten Antikörper nur an Antigene mit Peptid-Determinanten mit freien Aminogruppen zu binden vermögen.

2.2. Nachweis der Spezifität der Antiseren gegen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$,

 $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$ in der quantitati-

ven Präzipitationshemmung

In der Hapten-Hemmung verwendeten wir isoliertes γ -Globulin. Proteolytische Aktivität, die die Ergebnisse der Präzipitations-Hemmung verfälschen könnte (107), ließ sich dadurch eliminieren.

Zur Abtrennung von Antikörpern mit Spezifität gegen HSA oder RNase adsorbierte man alle Antiseren vor der Verwendung in der Hapten-Hemmung an dem jeweiligen Trägerprotein.

Die Hemmung der Präzipitationsreaktionen zwischen den Antiseren gegen die synthetischen Antigene $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$, $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$ und dem jeweiligen homologen Antigen ist in den Abbildungen 29-31, Seite 135, 137, 138 dargestellt.

Die Ergebnisse der Hapten-Hemmung zwischen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$ -Antiseren und dem homologen Antigen (Abbildung 29, Seite 135) bestärkten die Hoffnung, diese Antiseren für eine serologische Differenzierung von Oligo-Glycin und Oligo-L-Alanin-Interpeptidbrücken verwenden zu können. Die Antiseren besitzen hohe Affinität gegenüber Glycin-Peptiden mit freier α -Aminogruppe, wie sie auch in den Interpeptidbrücken von Staphylokokken vorkommen (Gly_2 , Gly_3 , Gly_4 , Gly_5 ; $\text{Gly}_4\text{-}\epsilon\text{-Acp}$ und $\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp}$ als Strukturanaloga von $\text{N}^6\text{-Gly}_4\text{-Lys}$ bzw. $\text{N}^6\text{-Gly}_5\text{-Lys}$). Die maxima-

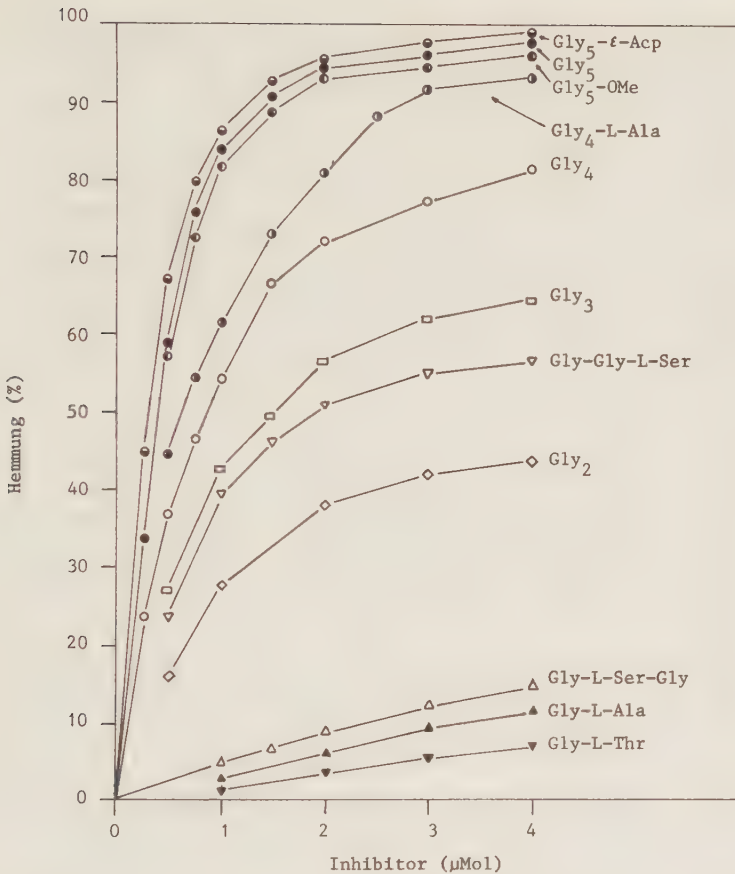


Abbildung 29. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA, an HSA absorbiert, und dem homologen Antigen. (●) Gly₅; (○) Gly₄; (◐) Gly₅-OMe; (◑) Gly₃; (◒) Gly₂; (◓) Gly₅-ε-Acp; (Δ) Gly-L-Ser-Gly; (◔) Gly-Gly-L-Ser; (◕) Gly₄-L-Ala; (▲) Gly-L-Ala; (▼) Gly-L-Thr;
keine Hemmung: L-Ser-Gly₂; L-Ala₄; L-Ala-Gly₄; Ac-Gly₅; L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala; L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂;

Die Größe des antigenen Bindungsbereiches liegt in der Größenordnung von Pentaglycin. Gly₅- ϵ -Acp weist gegenüber Pentaglycin keine erhöhte Hemmwirkung mehr auf.

Die Hemmkurven beweisen, daß kurze Glycinpeptide (Di- und Triglycin) ebenfalls an die gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA gebildeten Antikörper binden. Dies erscheint von besonderer Bedeutung, da, wie die Ergebnisse der Bestimmung freien C-terminalen Glycins schließen lassen, bis zu 20 % der Interpeptidbrückenpeptide nicht als Pentaglycin sondern als kürzere Glycinpeptide vorliegen. Diese kurzen Oligo-Glycinpeptide entstehen wahrscheinlich durch die Wirkung einer Endopeptidase, die Glycyl-Glycin-Brücken spaltet (16,143,144,158-160).

Peptide der N-terminalen Sequenz Gly-L-Ser-Gly- und Gly-Gly-L-Ser-, wie sie in den Interpeptidbrücken von Staphylokokken des N⁶-(Gly₄,L-Ser_{0.5-1.5})-L-Lys-Peptidoglycantyps auftreten (151,154), werden von den Antiseren gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA ebenfalls gebunden, allerdings mit geringerer Affinität als Homo-Glycinpeptide. Peptide mit N-terminalem L-Serin dagegen (L-Ser-Gly-Gly, L-Ser-Gly) hemmen die Präzipitation nicht.

Einige Staphylokokkenstämme (*S. lactis* I3, *S. sciuri*) (62,119) besitzen das Peptid Gly₄-L-Ala als Interpeptidbrücke. In der Hapten-Hemmung erweist sich dieses Peptid als beinahe ebenso starker Inhibitor wie Pentaglycin.

Peptide der Sequenz Gly-L-Ala und Gly-L-Thr (Interpeptidbrücken von *Str. viridans* IV K. 7733 bzw. *Str. salivarius* K. 21367) hemmen die Präzipitation schwach.

Von äußerster Wichtigkeit im Hinblick auf eine Verwendung der Antiseren zur Peptidoglycantyp-Differenzierung erweist sich das Ergebnis, daß weder L-Ala-Gly₄ (N-terminale Sequenz des Brückenpeptids von "*Micrococcus roseus*" CCM 168 und 1405; N⁶-(L-Ala-Gly₆)-Lys-Interpeptidbrücke) noch Oligo-L-Alanin-Peptide (L-Ala₂, L-Ala₃, L-Ala₄; Interpeptidbrückenpeptide vieler Streptokokken und Mikrokokken) an die gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA gebildeten Antikörper binden.

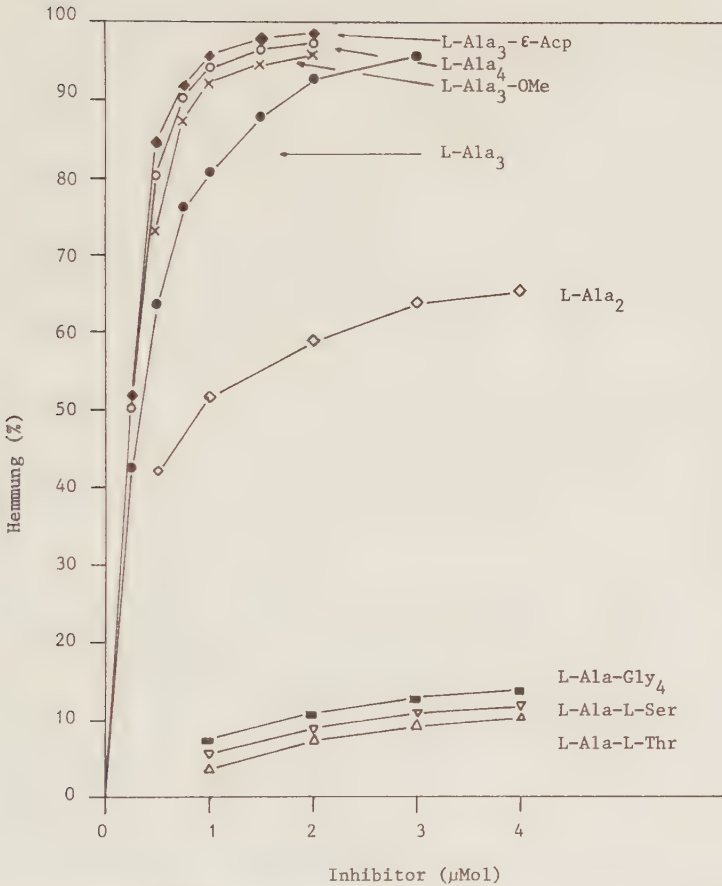


Abbildung 30. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA, an HSA absorbiert, und dem homologen Antigen. (○) L-Ala₄; (●) L-Ala₃; (◇) L-Ala₂; (◆) L-Ala₃-ε-Acp; (x) L-Ala₃-OMe; (■) L-Ala-Gly₄; (△) L-Ala-L-Thr; (▽) L-Ala-L-Ser; keine Hemmung: Gly₅; D-Ala₃; Ac-L-Ala₃; Ac₂-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala; Ac₂-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂; Gly-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂;

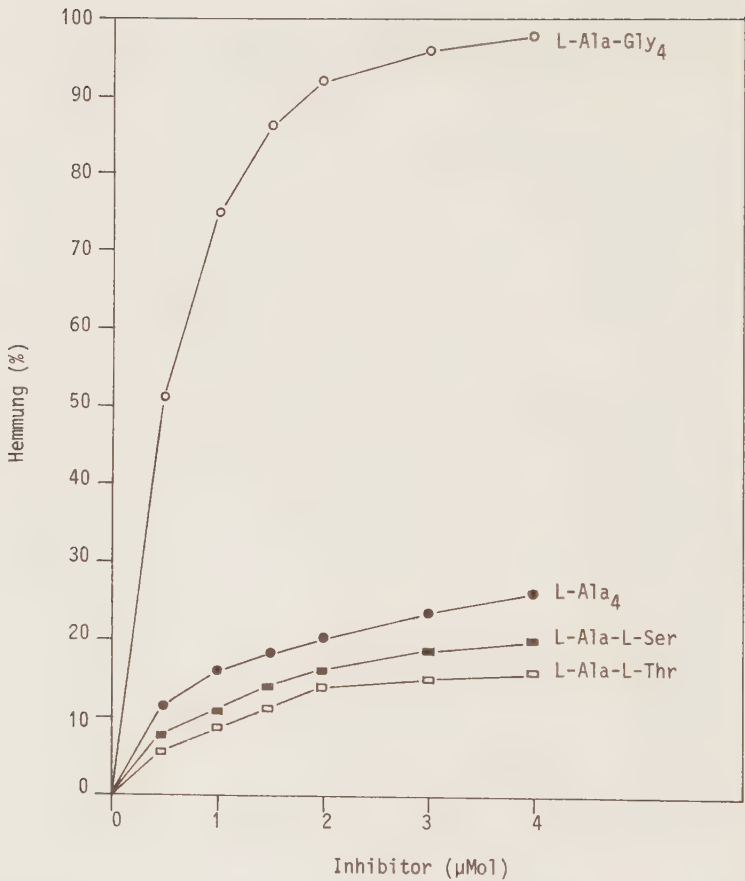


Abbildung 31. Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase, an RNase absorbiert, und dem homologen Antigen. (o) L-Ala-Gly₄; (●) L-Ala₄; (□) L-Ala-L-Thr; (■) L-Ala-L-Ser;
keine Hemmung: Gly₅; Ac₂-L-Ala- χ -D-Glu-L-Lys-D-Ala; Ac₂-L-Ala- χ -D-Glu-L-Lys-D-Ala₂; Gly- χ -D-Glu-L-Lys-D-Ala₂;

Die Hapten-Hemmung der homologen Präzipitationsreaktion der (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA-Antiseren (Abbildung 30, Seite 137) bestätigt die bereits aus den Kapillarpräzipitationen mit verschiedenen synthetischen Antigenen und Proteinen gezogenen Schlußfolgerungen (vgl. Tabelle 20, Seite 132). Die gegen Peptidketten der Sequenz L-Ala₃- ϵ -Acp- gebildeten Antikörper besitzen hohe Affinität gegenüber L-Alanin-Peptiden (L-Ala₄, L-Ala₃, L-Ala₃- ϵ -Acp, L-Ala₂, L-Ala₂- ϵ -Acp) und binden nicht an Oligo-Glycinpeptide (Gly₅, Gly₄, Gly₃, Gly₂) sowie an die bei einigen Streptokokken als Interpeptidbrücken vorkommenden Peptide mit N-terminalem Glycin, Gly-L-Ala und Gly-L-Thr. Die hohe Stereospezifität der Antikörper zeigt sich daran, daß D-Alanin-Peptide (D-Ala₂, D-Ala₃) nicht erkannt werden.

Die gegen die Sequenz L-Ala₃- ϵ -Acp- gerichteten Antikörper zeigen geringe Wechselwirkung mit Peptiden mit nur einem N-terminalen Alanin-Molekül (L-Ala-Gly₄; N-terminale Sequenz der Interpeptidbrücke von "Micrococcus roseus" CCM 168 und CCM 1405, oder mit L-Ala-L-Thr und L-Ala-L-Ser; Brückenpeptide einiger Streptokokken).

Abbildung 31, Seite 138, schließlich zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Spezifität der gegen (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase gebildeten Antikörper. Die Antiseren sind hochspezifisch gegen die eingeführten determinanten Gruppen L-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly- gerichtet und erlauben eine eindeutige Unterscheidung dieses Peptids von der Sequenz L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala- (nur geringe Hemmwirkung) oder von der Sequenz Gly-Gly-Gly-Gly-Gly- (keinerlei Hemmung).

Die Spezifitäten der einzelnen Antiseren sind, auch im Hinblick auf ihre Verwendung zur Peptidoglycantyp-Differenzierung, zusammenfassend in Tabelle 21, Seite 140, dargestellt.

Die vergleichende Hemmung mit N-acetylierten Peptiden, freien Peptiden und Peptid-Methylestern (z.B. Ac-Gly₅/Gly₅/Gly₅-OMe oder Ac-L-Ala₃/L-Ala₃/L-Ala₃-OMe) beweist, daß die Antikörper spezifisch gegen die freien N-Termini der antigenen Determinanten gerichtet sind.

Tabelle 21. Übersicht über die Spezifitäten der gegen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$, $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$ gebildeten Antiseren. * Sequenz entspricht der Interpeptid-brücke des Peptidoglycans der in Klammern angegebenen Bakterien;

<u>Affinität für Peptide der Sequenz</u>	<u>Antiserum gegen</u>		
	$(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$	$(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$	$(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$
Gly_5 *(<i>S. aureus</i>)	++++	-	-
Gly-Gly-L-Ser *(<i>S. epidermidis</i>)	+++	-	-
$\text{Gly}_4\text{-L-Ala}$ *(<i>S. sciuri</i>)	++++	-	-
L-Ala_3 *(<i>Mc. varians</i>)	-	++++	+
L-Ala-Gly_6 *(<i>"Mc. roseus"</i> CCM 168,1405)	-	+	++++
Gly-Thr, Gly-Ala, Ala-Thr, Ala-Ser, *(verschiedene Streptokokken)	+	-	-
	-	+	+

Das negative Ergebnis der Hemmung mit den Peptiden $\text{L-Ala-}\gamma\text{-D-Glu-L-Lys-D-Ala}$, $\text{L-Ala-}\gamma\text{-D-Glu-L-Lys-D-Ala}_2$ (homologe Präzipitation der $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$ -Antiseren) bzw. mit $\text{Ac}_2\text{-L-Ala-}\gamma\text{-D-Glu-L-Lys-D-Ala}$,

$\text{Ac}_2\text{-L-Ala-}\gamma\text{-D-Glu-L-Lys-D-Ala}_2$ oder $\text{Gly-}\gamma\text{-D-Glu-L-Lys-D-Ala}_2$ (homologe Präzipitation der $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}$ -Antiseren und der $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}$ -RNase-Antiseren) erlaubt, eine Bindung der gegen die synthetischen Peptidyl-Proteine gebildeten Antikörper an die Peptiduntereinheit aus-zuschließen.

2.3. Reaktion der Antiseren gegen die synthetischen Peptidyl-Proteine

mit Peptidoglycanen verschiedener Primärstrukturen

Die Ergebnisse der Hapten-Hemmung deuteten bereits an, daß mit Hilfe von Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}$ -HSA, $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}$ -HSA und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}$ -RNase die spezifische Unterscheidung verschiedener, als Interpeptidbrücken vorkommender Peptidsequenzen möglich ist. Die Präzipitationsreaktionen dieser Antiseren mit Peptidoglycanen verschiedener Primärstrukturen sollen nun aufzeigen, inwiefern sich solche Antiseren tatsächlich zur Bakteriendifferenzierung auf Grund unterschiedlicher Interpeptidbrücken-Sequenzen eignen.

Die quantitativen Präzipitationsreaktionen sind in den Abbildungen 32-34, Seite 142-144, dargestellt. Tabelle 22, Seite 145, gibt eine Übersicht über das Verhalten von Peptidoglycanen der verschiedensten Primärstrukturen mit Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine in der Latex-Agglutination.

Die Ergebnisse der quantitativen Präzipitationsreaktionen stimmen vollkommen mit denen der Latex-Reaktion überein.

Die Antiseren mit Spezifität gegen die Sequenz $\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp-}$ zeigen eine starke Kreuzreaktion mit allen Staphylokokken-Peptidoglycanen mit Penta- oder Hexaglycin-Interpeptidbrücken. Die Seren präzipitieren bzw. agglutinieren ebenfalls Peptidoglycane des $\text{Gly}_4\text{-L-Ser}_{0.5-1.5}$ -Quervernetzungsstyps, die Titer liegen hier in der Regel etwas niedriger als für Peptidoglycane mit Homo-Glycinbrücken. Eine starke Reaktion erhalten wir auch für Staphylokokken-Peptidoglycane mit einem $\text{Gly}_4\text{-L-Ala-}$ Brückenpeptid (S. sciuri).

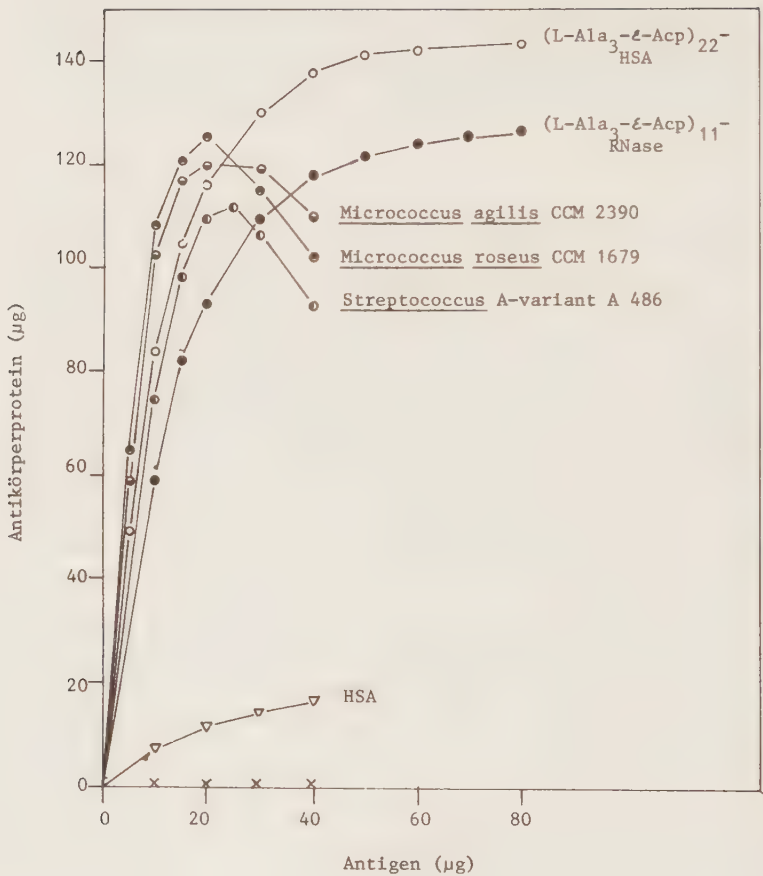


Abbildung 32. Quantitative Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA und (○) dem homologen Antigen; (●) (L-Ala₃-ε-Acp)₁₁-RNase; (▽) HSA; sowie Peptidoglycan von (●) *Mc. roseus* CCM 1679; (●) *Mc. agilis* CCM 2390; (○) *Streptococcus* A-variant A 486; (x) *S. aureus* H;

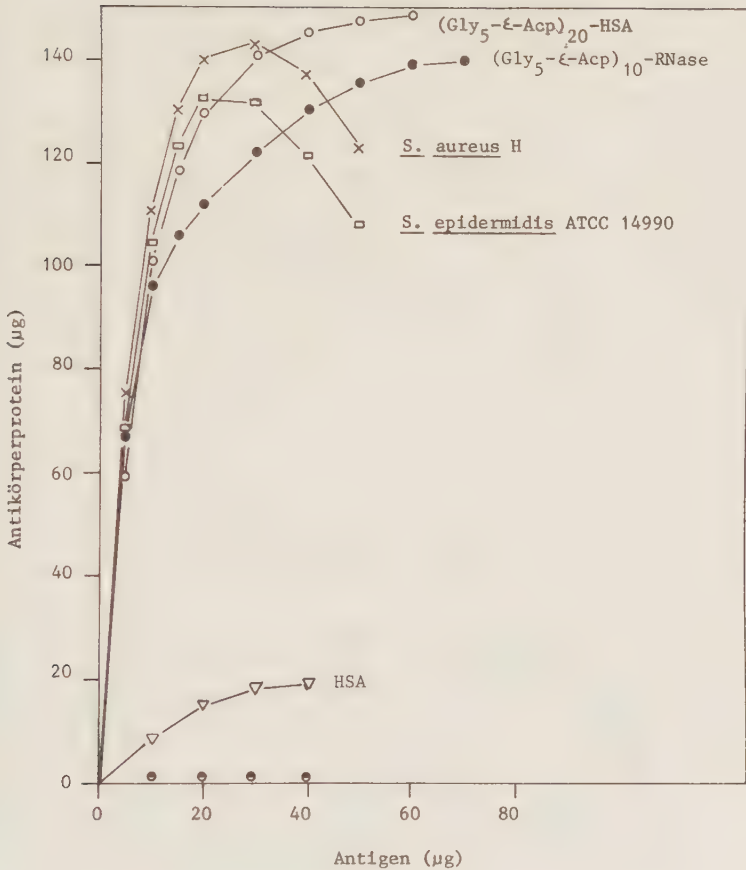


Abbildung 33. Quantitative Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA und (○) dem homologen Antigen; (●) (Gly₅-ε-Acp)₁₀-RNase; (▽) HSA; sowie Peptidoglycan von (x) S. aureus H; (□) S. epidermidis ATCC 14990; (●) Mc. roseus CCM 1679;

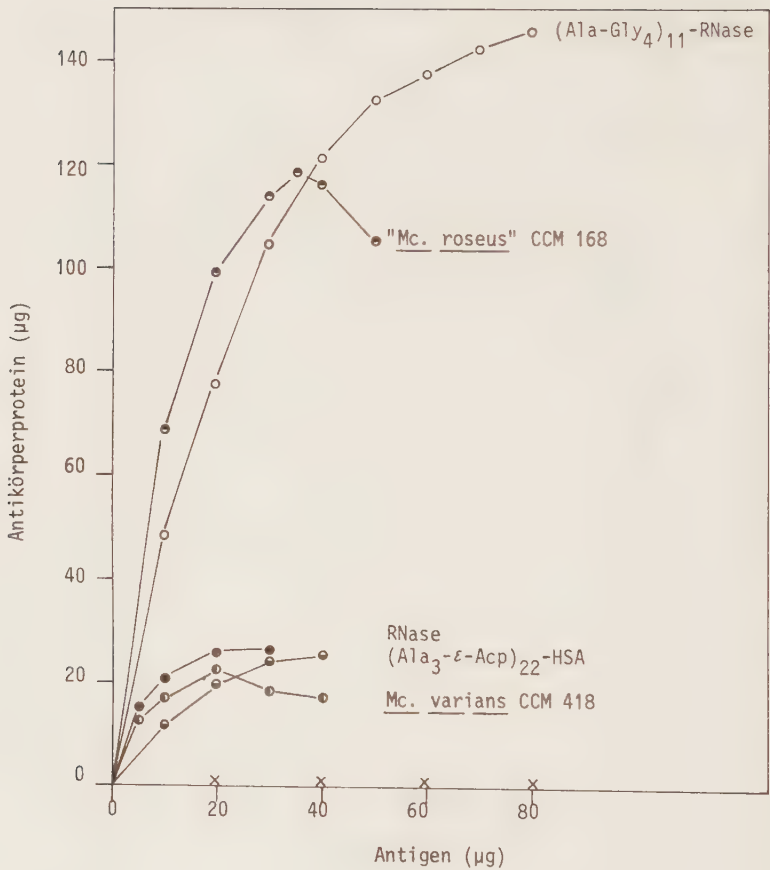


Abbildung 34. Quantitative Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase und (o) dem homologen Antigen; (●) RNase; (○) (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA; sowie Peptidoglycan von (●) "*Mc. roseus*" CCM 168; (●) "*Mc. varians*" CCM 418; (x) *S. aureus* H;

Tabelle 22. Latex-Agglutination von Antiseren gegen (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA, (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA und (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase mit Peptidoglycanen verschiedener Primärstrukturen; N-t.: N-terminal; * nicht bestimmt;

Bakterienstamm	Zusammensetzung und Sequenz der Interpeptidbrücke	N-t. Gly	N-t. Ala	Titer mit Antiserum gegen die Sequenz		
				Gly ₅ -ε-Acp-	L-Ala ₃ -ε-Acp-	L-Ala-Gly ₄ -
<u>S. aureus</u> H	N ⁶ -(Gly _{5,1})-Lys	(119)	0.04	1:1024	1:8	1:8
<u>S. aureus</u> Copenhagen	N ⁶ -(Gly _{4,3})-Lys	(119)	0.05	1:512	1:8	1:8
<u>S. aureus</u> ATCC 12600	N ⁶ -(Gly _{5,6})-Lys	(119)	*	1:1024	1:8	1:8
<u>S. aureus</u> ATCC 12601	N ⁶ -(Gly _{5,6})-Lys	(119)	*	1:1024	1:8	1:8
<u>S. xyloso</u> DSM 20266	N ⁶ -(Gly _{5,4})-Lys	(123)	0.04	1:1024	1:8	1:8
<u>S. cohnii</u> DSM 20260	N ⁶ -(Gly _{5,0})-Lys	(123)	0.06	1:1024	1:8	1:8
<u>S. spec.</u> CCM 2495	N ⁶ -(Gly _{4,7} ,L-Ser _{0,5})-Lys	(115)	0.03	1:512	1:4	1:4
<u>S. spec.</u> CCM 2574	N ⁶ -(Gly _{4,0} ,L-Ser _{1,0})-Lys	(153)	0.04	1:256	1:8	1:8
<u>S. haemolyticus</u> DSM 20264	N ⁶ -(Gly _{3,7} ,L-Ser _{1,2})-Lys	(123)	0.04	1:256	1:4	1:8
<u>S. epidermidis</u> ATCC 14990	N ⁶ -(Gly _{4,0} ,L-Ser _{0,5})-Lys	(119)	0.05	1:512	1:8	1:8
<u>S. hominis</u> J1 248	N ⁶ -(Gly _{4,0} ,L-Ser _{1,0})-Lys	(61)	0.05	1:256	1:4	1:4
<u>S. hominis</u> ATCC 27844	N ⁶ -(Gly _{4,1} ,L-Ser _{0,8})-Lys	(61)	*	1:256	1:4	1:4
<u>S. warneri</u> ATCC 27836	N ⁶ -(Gly _{4,2} ,L-Ser _{0,8})-Lys	(61)	0.04	1:512	1:8	1:8
<u>S. capitis</u> ATCC 27840	N ⁶ -(Gly _{4,1} ,L-Ser _{1,0})-Lys	(61)	*	1:256	1:8	1:8
<u>S. simulans</u> ATCC 27848	N ⁶ -(Gly _{4,9} ,L-Ser _{0,2})-Lys	(61)	*	1:512	1:4	1:4

Bakterienstamm	Zusammensetzung und Sequenz der Interpeptidbrücke	N-t. Gly	N-t. Ala	Titer mit Antiserum gegen die Sequenz		
				Gly ₅ -ε-Acp-	L-Ala ₃ -ε-Acp-	L-Ala-Gly ₄ -
<u>S. saprophyticus</u> CCM 883	N ⁶ -(Gly _{4,3} ,L-Ser _{0,8})-Lys (61)	*	*	1:256	1:4	1:4
<u>S. lactis</u> I3	N ⁶ -(Gly ₄ -L-Ala)-Lys (119)	0.24	0.03	1:512	1:4	1:4
<u>Mc. radiodurans</u>	N ⁵ -(Gly ₂)-Orn (116)	0.18	0.06	1:128	1:2	1:4
" <u>Mc. roseus</u> " CCM 168	N ⁶ -(L-Ala-Gly ₆)-Lys (119)	0.01	0.24	0	1:64	1:512
" <u>Mc. roseus</u> " CCM 1405	N ⁶ -(L-Ala-Gly ₆)-Lys (119)	*	*	0	1:32	1:512
<u>Mc. kristinae</u> ATCC 27570	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (60)	0	*	0	1:1024	1:32
<u>Mc. varians</u> CCM 418	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (60)	0	0.26	0	1:2048	1:32
<u>Mc. varians</u> CCM 884	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (60)	0	*	0	1:2048	1:32
<u>Mc. roseus</u> CCM 1679	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (119)	0	0.21	0	1:1024	1:64
<u>Mc. roseus</u> ATCC 418	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (119)	0	*	0	1:1024	1:32
<u>Mc. roseus</u> CCM 189	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (119)	0	*	0	1:1024	1:32
<u>Str. uberis</u> K. 21342	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (49)	0	*	0	1:512	*
<u>Str. spec.</u> K. 21361	N ⁶ -(L-Ala ₃₋₄)-Lys (49)	0	*	0	1:512	1:32
<u>Mc. agilis</u> CCM 2390	N ⁶ -(L-Ala ₃ -L-Thr)-Lys (66)	0	0.18	0	1:512	1:32
<u>Str. A-variant</u> A486	N ⁶ -(L-Ala ₂₋₃)-Lys (122)	0	*	0	1:256	1:32
<u>Str. pyogenes</u> K. 4875	N ⁶ -(L-Ala ₂₋₃)-Lys (49)	0	*	0	1:256	1:32

Bakterienstamm	Zusammensetzung und Sequenz der Interpeptidbrücke	N-t. Gly	N-t. Ala	Titer mit Antiserum gegen die Sequenz		
				Gly ₅ -ε-Acp-	L-Ala ₃ -ε-Acp-	L-Ala-Gly ₄ -
<u>Str. dysgalactiae</u> K. 2200	N ⁶ -(L-Ala ₂₋₃)-Lys (49)	0	*	0	1:256	1:32
<u>Str. faecalis</u> K. 11788	N ⁶ -(L-Ala ₂₋₃)-Lys (54)	0	*	0	1:512	1:32
<u>Str. faecalis</u> ATCC 13399	N ⁶ -(L-Ala ₂₋₃)-Lys (54)	0	*	0	1:512	1:32
<u>Str. salivarius</u> K. 21372	N ⁶ -(L-Ala ₂₋₃)-Lys (49)	0	*	0	1:256	1:16
<u>Str. spec.</u> K. 25926	N ⁶ -(L-Ala ₂₋₃ ,L-Ser _{0.3})-Lys (49)	0	*	0	1:128	*
<u>Str. agalactiae</u> K. 25886	N ⁶ -(L-Ala ₁₋₂ ,L-Ser _{0.35})-Lys (49)	0	*	0	1:128	*
<u>Str. mutans</u> K. 25859	N ⁶ -(L-Ala-L-Thr)-Lys (49)	0	*	0	1:64	*
<u>Str. cremoris</u> 316a	N ⁶ -(L-Ala-L-Thr)-Lys (111)	0	0.35	0	1:32	*
<u>Str. bovis</u> K. 25794	N ⁶ -(L-Ser/L-Ala-L-Thr)-Lys (49)	0	*	0	1:32	1:16
<u>Mc. luteus</u> CCM 169	N ⁶ -(PU) ₁₋₃ -Lys (119)	0	0.16	0	1:32	1:64
<u>Str. viridans</u> IV K. 7733	N ⁶ -(Gly-L-Ala)-Lys (49)	*	*	1:32	1:4	1:4
<u>Str. salivarius</u> K. 21367	N ⁶ -(Gly-L-Ala)-Lys (49)	*	*	1:32	1:2	1:4
<u>Mc. lylae</u> ATCC 27566	N ⁶ -(β-D-Asp(NH ₂))-Lys (60)	0	0.02	0	1:2	1:4
<u>Str. faecium</u> K. 11750	N ⁶ -(β-D-Asp(NH ₂))-Lys (54)	0	*	0	1:4	*
<u>Str. faecium</u> K. 11717	N ⁶ -(β-D-Asp(NH ₂))-Lys (54)	0	*	0	1:4	*

Bakterienstamm	Zusammensetzung und Sequenz der Interpeptidbrücke	N-t. Gly	N-t. Ala	Titer mit Antiserum gegen die Sequenz		
				GLY ₅ -ε-Acp-	L-Ala ₃ -ε-Acp-	L-Ala-Gly ₄ -
<u>Mc. sedentarius</u> CCM 314	vollständige Primärstruktur (60)	0	*	0	1:8	1:8
<u>Mc. sedentarius</u> TW 93	unbekannt; Mur-L-Ala-γ-D-	0	*	0	1:8	1:8
<u>Mc. sedentarius</u> BH 252	Glu-L-Lys-D-Ala ₁₋₂ -PU; γ-Glu-	0	*	0	1:8	1:8
<u>Mc. sedentarius</u> DM 51	Glu-IP; N-t. L-Ala u. Glu	0	*	0	1:8	1:8
<u>Str. viridans</u> I K. 104	L-Lys-direkt (49)	0	*	0	1:4	1:4
<u>Str. spec. K. 13272</u>	L-Lys-direkt (49)	0	0	0	1:2	1:2
<u>B. subtilis</u> W23	meso-Dpm-direkt (163)	0	0.01	0	0	*
<u>Mc. nishinomiyaensis</u> JL5	N ⁶ -(γ-D-Glu-L-Ser ₂)-Lys (65)	0	0.03	0	1:2	1:2
<u>Mb. lacticum</u> IMRU 630	D-Glu-(Gly-Lys)- Lys Lys	*	0	1:2	0	0

Somit zeigen die Antiseren gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA eine starke Reaktion mit Peptidoglycanen aller bisher bei Staphylokokken bekannten Quervernetzungstypen.

Die quantitative Präzipitations-Hemmungsreaktion zeigt eine Abnahme der Hemmwirkung innerhalb der homologen Reihe der Glycinpeptide von Pentaglycin zu Diglycin auf. Die schwache Präzipitation bzw. Agglutination mit Peptidoglycan von Micrococcus radiodurans (Diglycin als Interpeptidbrücke) im Vergleich zu den starken Reaktionen mit Peptidoglycanen mit Pentaglycinbrücken bestätigt die Ergebnisse der Präzipitations-Hemmreaktion.

Die Hapten-Hemmungsreaktion zeigte an, daß die Antiseren mit Spezifität gegen die Sequenz Gly₅- ϵ -Acp- an Peptide mit N-terminalem L-Alanin (L-Ala-Gly₄, L-Ala₄, L-Ala₃, L-Ala₂) nicht binden. Die Ergebnisse der Reaktion der Antiseren gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA mit Peptidoglycanen mit L-Ala-Gly₆- oder Oligo-L-Alanin-Brücken stimmen völlig mit denen der Präzipitationshemmung überein. Während Peptidoglycane mit Pentaglycinbrücken mit den (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA-Antiseren Agglutinationen zwischen 1:256 und 1:1024 ergeben und in der quantitativen Präzipitation stark reagieren, erhalten wir für Peptidoglycane mit L-Ala-Gly₆- oder Oligo-L-Alanin-Interpeptidbrücken (Mikrokokken, Streptokokken) keinerlei Reaktionen.

Als "negative Kontrolle" verwendeten wir als Antigene eine Reihe Peptidoglycane ohne Glycinbrücken. Für den erneuten Beweis der hohen Spezifität der Antiseren gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA erweist sich von besonderer Bedeutung, daß wir mit all diesen Peptidoglycanen keine Präzipitation bzw. Agglutination erhalten.

Antiseren gegen die Sequenz L-Ala₃- ϵ -Acp- präzipitieren stark und ergeben Agglutinationstiter von 1:256 bis 1:2048 mit Mikrokokken- und Streptokokken-Peptidoglycanen mit L-Ala₃₋₄- oder L-Ala₂₋₃-Brückenpeptiden. Peptidoglycane des N⁶-(L-Ala₃-L-Thr)-Lys oder N⁶-(L-Ala₂₋₃, L-Ser_{0,3})-Lys-Quervernetzungstyps ergeben ebenfalls relativ hohe Titer

(1:512, 1:256), während Peptidoglycane mit L-Ala-L-Thr- oder mit L-Ala-Gly₆-Interpeptidbrücken (Streptokokken bzw. "Micrococcus roseus" CCM 168 und CCM 1405) nur mäßig an die (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA-Antiseren binden. Alle Staphylokokken dagegen zeigen in der quantitativen Präzipitationsreaktion mit den Antiseren gegen die Sequenz L-Ala₃- ϵ -Acp- keinerlei Reaktion und geben in der weit empfindlicheren Latex-Agglutination nur äußerst schwache Titer (1:4, 1:8).

Ähnlich schwache Titer (0 bis maximal 1:8) erhalten wir mit Peptidoglycanen, die wir als "negative Kontrollen" einsetzten (z.B. B. subtilis, Mb. lacticum, Mc. lylae).

Die Antiseren gegen die Sequenz L-Ala-Gly₄- präzipitieren und agglutinieren stark mit Peptidoglycanen mit L-Ala-Gly₆-Interpeptidbrücken ("Mc. roseus" CCM 168 und CCM 1405). Die schwache Reaktion mit Peptidoglycanen mit Oligo-L-Alanin-Brückenpeptiden (L-Ala₃₋₄- und L-Ala₂₋₃-Interpeptidbrücken von Mikrokokken und Streptokokken, Titer von 1:16 bis 1:64) läßt sich vermutlich auf gemeinsames N-terminales L-Alanin in den Brückenpeptiden der Peptidoglycane und der determinanten Gruppen der synthetischen Antigene zurückführen.

Die hohe Spezifität der Antikörper demonstriert der Vergleich der Reaktion von Peptidoglycanen mit Pentaglycin-Interpeptidbrücken und von Peptidoglycanen mit L-Ala-Gly₆-Brückenpeptiden. Die Antiseren mit Spezifität gegen die Sequenz L-Ala-Gly₄- erlauben eindeutig die serologische Unterscheidung des für Staphylokokken charakteristischen N⁶-(Gly₅₋₆)-Lys-Quervernetzungstyps (Titer 1:4, 1:8) von Peptidoglycanen von "Micrococcus roseus" CCM 168 und CCM 1405 mit L-Ala-Gly₆-Interpeptidbrücken. Die beiden Interpeptidbrücken unterscheiden sich in ihrem N-terminalen Bereich nur durch den Ersatz eines L-Alanins durch Glycin.

Die Ergebnisse der Reaktionen zwischen den Peptidyl-Protein-Antiseren und Peptidoglycanen verschiedener Primärstrukturen beweisen, daß die

Antiseren gegen die synthetischen Antigene $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$, $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$ eine klare serologische Differenzierung verschiedener Peptidoglycantypen erlauben. Eine zusammenfassende Übersicht über die Anwendung der Antiseren gegen die synthetischen Peptidyl-Proteine zur Differenzierung von Bakterien auf Grund ihrer Peptidoglycanstruktur gibt Tabelle 23.

Tabelle 23. Anwendung der Antiseren gegen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$, $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$ zur Differenzierung zwischen Staphylokokken, Mikrokokken bzw. Streptokokken mit Oligo-L-Alanin-Interpeptidbrücken und "Micrococcus roseus" CCM 168 und CCM 1405

<u>Interpeptid- brücke</u>	<u>Bakterien- gattung bzw. -Art</u>	<u>Präzipitation mit Antiseren gegen die Sequenz</u>		
		<u>$\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp-}$</u>	<u>$\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp-}$</u>	<u>$\text{L-Ala-Gly}_4\text{-}$</u>
$\text{Gly}_5\text{-}$ $\text{Gly}_4\text{-L-Ser}_{0.5-1.5}\text{-}$ $\text{Gly}_4\text{-L-Ala-}$	Staphylo- kokken	++++	-	-
$\text{L-Ala}_3\text{-4-}$ $\text{L-Ala}_2\text{-3-}$	Mikrokok- ken, Strep- tokokken	-	++++	+
$\text{L-Ala-Gly}_6\text{-}$	" <u>Mc. roseus</u> " 168, 1405	-	+	++++

2.4. Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktionen zwi-

schen den Peptidyl-Protein-Antiseren und Peptidoglycan

Die Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktionen zwischen den Peptidyl-Protein-Antiseren und Peptidoglycan bestätigte erneut die Spezifität der Antiseren für die als antigene Determinante in die Trägerproteine eingeführten Peptidsequenzen. Die folgenden Präzipitationssysteme wurden in der Hapten-Hemmung untersucht:

- (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA-Antiserum/Peptidoglycan von S. aureus H
- (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA-Antiserum/Peptidoglycan von Mc. varians CCM 418
- (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase-Antiserum/Peptidoglycan von "Mc. roseus" CCM 168

Die Ergebnisse der Hapten-Hemmung ähneln sehr denjenigen, die wir für die Hemmung der homologen Präzipitationsreaktionen der Peptidyl-Protein-Antiseren erhielten (vgl. 2.2.; Seite 134). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Hapten-Hemmung gibt Tabelle 24, Seite 150.

3. Screeningtest zur Bestimmung des Peptidoglycantyps an ganzen Bakte-

rienzen

Die in Kapitel 2.3., Seite 141, beschriebene serologische Differenzierung zwischen verschiedenen Peptidoglycantypen wurde an isolierten Peptidoglycanen durchgeführt. Der Versuch, ganze Bakterienzellen mit den Antiseren gegen die synthetischen Peptidyl-Proteine zu agglutinieren, führte zu enttäuschenden Ergebnissen (Tabelle 25, Seite 151, Spalte A). Während wir mit Staphylokokken-Peptidoglycanen für die (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA-Antiseren Titer zwischen 1:256 und 1:1024 erhalten und Mikrokokken-Peptidoglycane mit Oligo-L-Alanin-Interpeptidbrücken die (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA-Antiseren bis zu Verdünnungsstufen zwischen 1:512 und 1:2048 agglutinieren, ergeben die ganzen Bakterienzellen nur

Tabelle 24. 50-prozentige Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen den Peptidyl-Protein-Antiseren und Peptidoglycan

Hapten	Inhibitor-Konzentration ($\mu\text{M}/\text{mg}$ AK-Protein)		
	(Gly ₅ - ϵ -Acp) ₂₀ -HSA-Anti-serum; Peptidoglycan von <u>S. aureus</u> H	(L-Ala ₃ - ϵ -Acp) ₂₂ -HSA-Anti-serum; Peptidoglycan von <u>Mc. roseus</u> CCM 418	(L-Ala-Gly ₄) ₁₁ -RNase-Anti-serum; Peptidoglycan von <u>"Mc. roseus"</u> CCM 168
Gly ₅	0.325	0	0
Gly ₄	0.525	0	0
Gly ₃	0.750	0	0
Gly ₂	1.075	0	0
L-Ala ₄	0	0.270	12.4
L-Ala ₃	0	0.750	13.65
L-Ala ₂	0	1.6	14.0
L-Ala-Gly ₄	0	15.6	0.290

Tabelle 25. Serologische Differenzierung zwischen Staphylokokken und Mikrokokken - Schnelltest zur Bestimmung des Peptidoglycantyps an ganzen Bakterienzellen

	Agglutinationstiter mit Antiserum gegen die Sequenz									
	Gly ₅ - L-Ala ₃ -		Gly ₅ - L-Ala ₃ -		Gly ₅ - L-Ala ₃ -		Gly ₅ - L-Ala ₃ -		Gly ₅ - L-Ala ₃ -	
	A		B		C		D		E	
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	1:8	0	1:16	0	1:32	0	1:64	0	1:64	1:2
<i>S. aureus</i> ATCC 12601	1:8	0	1:16	0	1:32	0	1:64	0	1:64	1:2
<i>S. aureus</i> Copenhagen	1:4	0	1:8	0	1:16	0	1:32	0	1:32	0
<i>S. aureus</i> H	1:8	0	1:16	0	1:32	0	1:64	0	1:128	1:2
<i>S. capitis</i> ATCC 27840	1:4	0	1:16	0	1:32	0	1:64	0	1:64	1:2
<i>S. cohnii</i> DSM 20260	1:2	0	1:8	0	1:16	0	1:32	0	1:32	0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	1:4	0	1:16	0	1:32	0	1:32	0	1:64	0
<i>S. haemolyticus</i> DSM 20264	1:4	0	1:8	0	1:16	0	1:16	0	1:32	0
<i>S. hominis</i> ATCC 27844	1:4	0	1:8	0	1:32	0	1:64	0	1:128	0
<i>S. saprophyticus</i> CCM 883	1:2	0	1:8	0	1:16	0	1:32	0	1:32	0
<i>S. sciuri</i> ATCC 29062	1:2	0	1:8	0	1:32	0	1:64	0	1:64	0
<i>S. simulans</i> ATCC 27848	1:2	0	1:8	0	1:16	0	1:64	0	1:64	0
<i>S. species</i> CCM 2495	0	0	1:8	0	1:32	0	1:64	0	1:128	1:2
<i>S. xylosus</i> DSM 20266	1:4	0	1:8	0	1:16	0	1:32	0	1:64	1:2
<i>S. warneri</i> DSM 27836	1:4	0	1:8	0	1:16	0	1:32	0	1:64	0
<i>Mc. kristinae</i> PM 129	0	1:4	0	1:8	0	1:16	0	1:16	0	1:32
<i>Mc. roseus</i> H 15	0	0	0	1:8	0	1:32	0	1:64	0	1:128
<i>Mc. varians</i> CCM 884	0	1:2	0	1:4	0	1:8	0	1:16	0	1:32
<i>B. subtilis</i> W 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A = Zellen unbehandelt

B = 15 Minuten Inkubation mit 10-prozentiger TCA bei 100 °C;

C = 30 Minuten Inkubation mit 10-prozentiger TCA bei 100 °C;

D = 30 Minuten Inkubation mit 10-prozentiger TCA bei 100 °C + 1 Stunde Inkubation mit Trypsin bei 37 °C;

E = 30 Minuten Inkubation mit 10-prozentiger TCA bei 100 °C + 2 Stunden Inkubation mit Trypsin bei 37 °C;

sehr schwache Agglutinationstiter (1:2 bis 1:8). Für Staphylococcus species CCM 2495 und Micrococcus roseus H 15 fällt die "Peptidoglycantyp-spezifische" Agglutination mit den entsprechenden Antiseren sogar negativ aus, obwohl die chemische Zusammensetzung der Interpeptidbrücken dieser Bakterien und die hohen Titer mit den isolierten Peptidoglycanen in der Latex-Reaktion eine positive Reaktion erwarten ließen.

Diese, in Spalte A der Tabelle 25 aufgeführten Ergebnisse, deuten eine weitgehende Maskierung der antigenen Determinanten des Peptidoglycans in ganzen Zellen durch andere Zellwandbestandteile (Proteine, Polysaccharide, Teichonsäuren) an. Wir versuchten deshalb, die Antigenität des Peptidoglycans durch Behandlung der ganzen Bakterienzellen mit Trypsin und/oder Extraktion mit Trichloressigsäure zu erhöhen. Die Ergebnisse der Tabelle 25, Spalten B - E, zeigen, daß bereits eine kurzzeitige Inkubation der Bakterien zu einer deutlichen spezifischen Erhöhung der Agglutinationstiter führt und diese Vorbehandlung der Zellen eine serologische Bestimmung des Peptidoglycantyps an ganzen Zellen ermöglicht.

Die "Anti-Staphylokokken-Seren" (Antiseren gegen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$) agglutinieren vorbehandelte Staphylokokkenzellen ausnahmslos mit Titern von 1:32 bis 1:128, während diese Antiseren mit allen anderen getesteten Bakterien keinerlei Reaktion zeigen.

Die Antiseren gegen $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ agglutinieren dagegen alle untersuchten Mikrokokken mit Oligo-L-Alanin-Interpeptidbrücken (Titer zwischen 1:32 und 1:128), während alle anderen Bakterien ohne solche Interpeptidbrücken keine oder nur eine äußerst schwache Reaktion (Titer 1:2) ergeben.

4. Spezifische Antikörper gegen die Interpeptidbrücke in Antiseren gegen ganze Bakterienzellen

Die quantitative Bestimmung der freien N-Termini zeigt, daß in der Regel im Peptidoglycan mindestens 15 % der Interpeptidbrückenpeptide

nicht quervernetzt vorliegen. Die Frage, inwieweit diese Brückenpeptide mit freien terminalen Aminogruppen als antigene Determinanten für die Synthese spezifischer "Interpeptidbrücken-Antikörper" verantwortlich sind, soll mit Hilfe der synthetischen Antigene geklärt werden.

4.1. Antiseren gegen Streptococcus A-variant

Die Ergebnisse der Kapillarpräzipitation zwischen Antiseren gegen Streptococcus A-variant und einer Reihe synthetischer Antigene faßt Tabelle 26 zusammen.

Tabelle 26. Kapillarpräzipitation zwischen Streptococcus A-variant-Antiseren und einer Reihe synthetischer Antigene

<u>Antigen</u>	<u>Präzipitationsreaktion</u>
(L-Ala ₃ -ε-Acp) ₂₂ -HSA	++
(L-Ala ₃ -ε-Acp) ₁₁ -RNase	++
(Gly ₅ -ε-Acp) ₂₀ -HSA	-
HSA-(CH ₂ CO-L-Ala ₅) ₃₅	-
HSA	-
RNase	-

Die Abbildung 35, Seite 154, zeigt die Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Streptococcus A-variant-Antiserum und (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA.

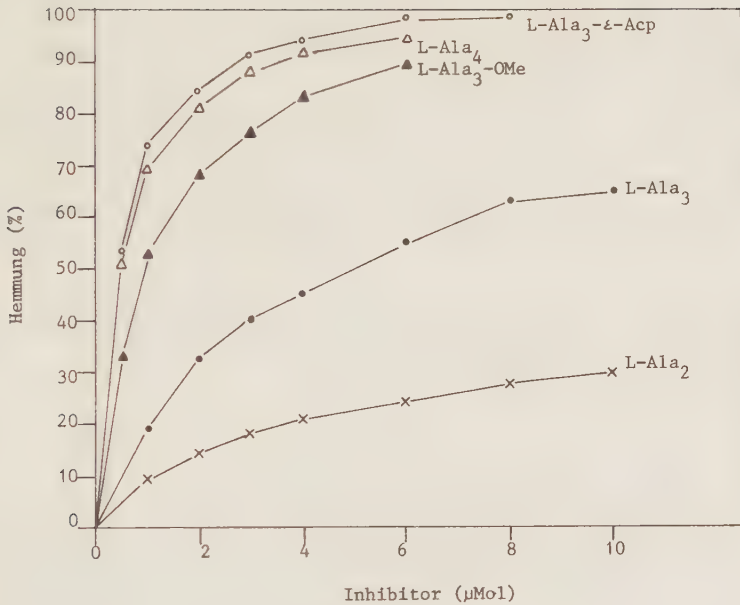


Abbildung 35. Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Antiseren gegen Streptococcus A-variant und (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA. (o) L-Ala₃-ε-Acp; (Δ) L-Ala₄; (▲) L-Ala₃-OMe; (●) L-Ala₃; (x) L-Ala₂; Pentaglycin, D-Ala₃, L-Ala₃, Ac₂-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala und Ac₂-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala₂ zeigen bei einer Konzentration von 10 µM/mg Antikörperprotein keinerlei Hemmung;

Aus den Antiseren gegen Streptococcus A-variant lassen sich mit synthetischen Antigenen, die als antigene Determinante L-Ala₃- ϵ -Acp-Peptide mit N-terminalem L-Alanin tragen, spezifisch Antikörper präzipitieren. Die Antigene (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA (Pentaglycinpeptide mit N-terminalem Glycin als determinante Gruppe) sowie HSA-(CH₂CO-L-Ala₅)₃₅ (Penta-L-Alanin mit freier Carboxylgruppe als antigene Determinante) dagegen zeigen keinerlei Reaktion.

Die spezifische Hemmbarkeit der Präzipitationsreaktion zwischen Streptococcus A-variant-Antiseren und (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA mit Oligo-L-Alaninpeptiden beweist, daß die Antikörper spezifisch gegen die Di- und Tri-L-Alanin-Interpeptidbrücken von Streptococcus A-variant gerichtet sind.

Die Ergebnisse charakterisieren die Interpeptidbrücke von Streptococcus A-variant neben der Peptiduntereinheit und Anteilen des Glycanstranges als weitere antigene Determinante des Peptidoglycans.

4.2. Antiseren gegen Staphylococcus aureus 52A5

Ranu (99) beschreibt für Staphylococcus aureus spezifische Antikörper, die gegen Glycinpeptide mit freier Aminogruppe gerichtet sind, sowie Antikörper mit Spezifität für Glycinpeptide mit freier Carboxylgruppe. Die Glycinpeptide mit freien C-Termini in den Interpeptidbrücken von Staphylococcus aureus entstehen als Produkt einer Endopeptidase-Aktivität (16,143,144,158-160).

Erste Untersuchungen an Antiseren gegen Staphylococcus aureus 52A5, der sich infolge fehlender Teichonsäure besonders zur Darstellung von Antikörpern gegen das Peptidoglycan eignet, bestätigen diese Untersuchungen Ranus (Seidl und Schleifer, unveröffentlichte Ergebnisse). Einen Überblick über diese Ergebnisse gibt Tabelle 27, Seite 156.

Aus den Antiseren gegen Staphylococcus aureus 52A5 lassen sich sowohl mit (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA als auch mit HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ spezifisch Antikörper präzipitieren. Die Präzipitationsreaktion mit (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-

HSA als Antigen erwies sich nur durch vorherige Absorption der Antiseren an einem Konjugat als hemmbar, das Pentaglycinpeptide mit freien N-Termini aufweist. Ein entsprechendes synthetisches Antigen mit Pentaglycinketten mit freien Carboxylgruppen weist dagegen keine Wirkung auf.

Analog läßt sich die Präzipitation mit HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ als Antigen nur durch Absorption der Seren an RNase-(CH₂CO-Gly₅)₁₁, nicht jedoch mit (Gly₅-ε-Acp)₁₁-RNase hemmen.

Tabelle 27. Präzipitation zwischen Antiseren gegen Staphylococcus aureus 52A5 und verschiedenen synthetischen Antigenen

<u>Antigen</u>	<u>Präzipitation mit Antiserum gegen Staphylococcus aureus</u>		
	a) <u>nicht ab-</u> <u>sorbiert</u>	b) <u>absorbiert an</u> <u>(Gly₅-ε-Acp)₁₁-</u> <u>RNase</u>	c) <u>absorbiert an</u> <u>RNase-(CH₂CO-</u> <u>Gly₅)₁₁</u>
(Gly ₅ -ε-Acp) ₂₀ -HSA	++	-	++
HSA-(CH ₂ CO-Gly ₅) ₃₁	++	++	-
(L-Ala ₃ -ε-Acp) ₂₂ -HSA	-	-	-
HSA	-	-	-

Diese Ergebnisse deuten in den Antiseren gegen Staphylococcus aureus zwei Antikörperpopulationen mit folgenden Spezifitäten an:

- a) Glycinpeptide mit freien Carboxylgruppen als antigene Determinante
- b) Glycinpeptide mit freien N-Termini als antigene Determinante

4.3. Antiseren gegen Micrococcus luteus

- - - - -

Die Präzipitationsreaktionen zwischen Micrococcus luteus-Antiseren und $(L-Ala_3-\epsilon-Acp)_{22}$ -HSA sowie $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$ erbrachten ein überraschendes Ergebnis. Beide Konjugate zeigen mit den Antiseren eine schwache Präzipitation; mit dem Trägerprotein HSA erhalten wir keine Reaktion. Diese Kreuzreaktion läßt sich nur durch spezifische Antikörper erklären, die gegen C-terminales Glycin und gegen N-terminales L-Alanin der polymerisierten Peptiduntereinheit gebildet wurden und schwache Wechselwirkungen mit den synthetischen Antigenen zeigen (Abbildung 36, Seite 158).

Absorbiert man die Antiseren gegen Micrococcus luteus an $(L-Ala_3-\epsilon-Acp)_{22}$ -HSA und präzipitiert dann mit $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$, erhält man im Vergleich zu der Reaktion zwischen nicht absorbiertem Micrococcus luteus-Antiserum und $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$ eine stark verminderte Präzipitation (vgl. Abbildung 36).

Analog läßt sich die Präzipitation zwischen Micrococcus luteus-Antiserum und $(L-Ala_3-\epsilon-Acp)_{22}$ -HSA durch vorherige Absorption der Antiseren an $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$ hemmen.

Diese Ergebnisse deuten die erstaunliche Tatsache an, daß dieselbe Antikörperpopulation in den Micrococcus luteus-Antiseren sowohl an ein synthetisches Antigen mit Peptidketten mit N-terminalem L-Alanin als auch an ein Konjugat mit Peptiddeterminanten mit C-terminalem Glycin bindet. Auf eine Wechselwirkung mit dem Trägerprotein (HSA) kann dies nicht zurück geführt werden, da, wie oben ausgeführt, HSA mit den Antiseren gegen Micrococcus luteus keine Präzipitation ergibt.

Die Hapten-Hemmung der Präzipitationsreaktionen zwischen Antiserum ge-

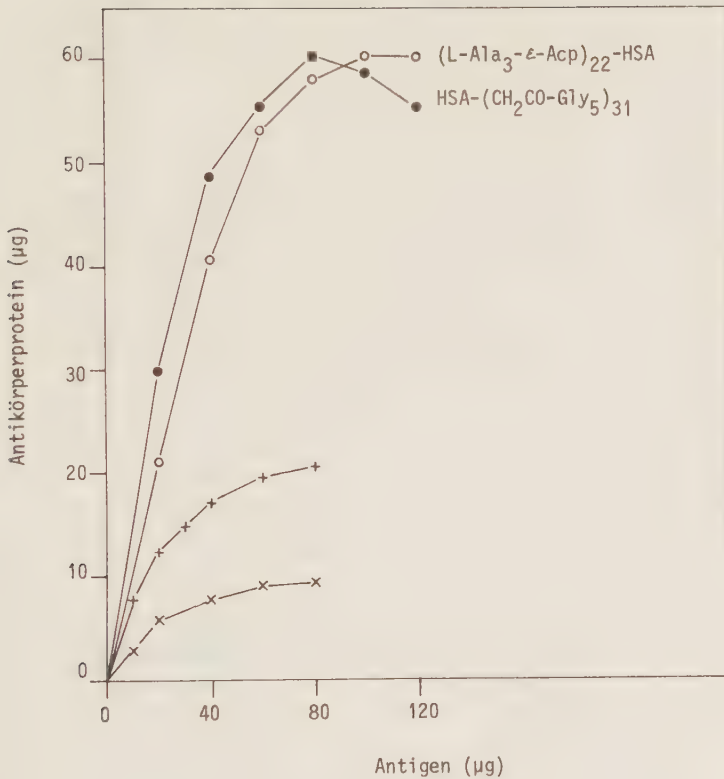


Abbildung 36. Quantitative Präzipitationsreaktion zwischen Antiseren gegen *Micrococcus luteus* und (o) (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA sowie (●) HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁.

(+) Antiserum adsorbiert an (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA, und nachfolgende Präzipitation mit HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁;

(x) Antiserum adsorbiert an HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁, und nachfolgende Präzipitation mit (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA;

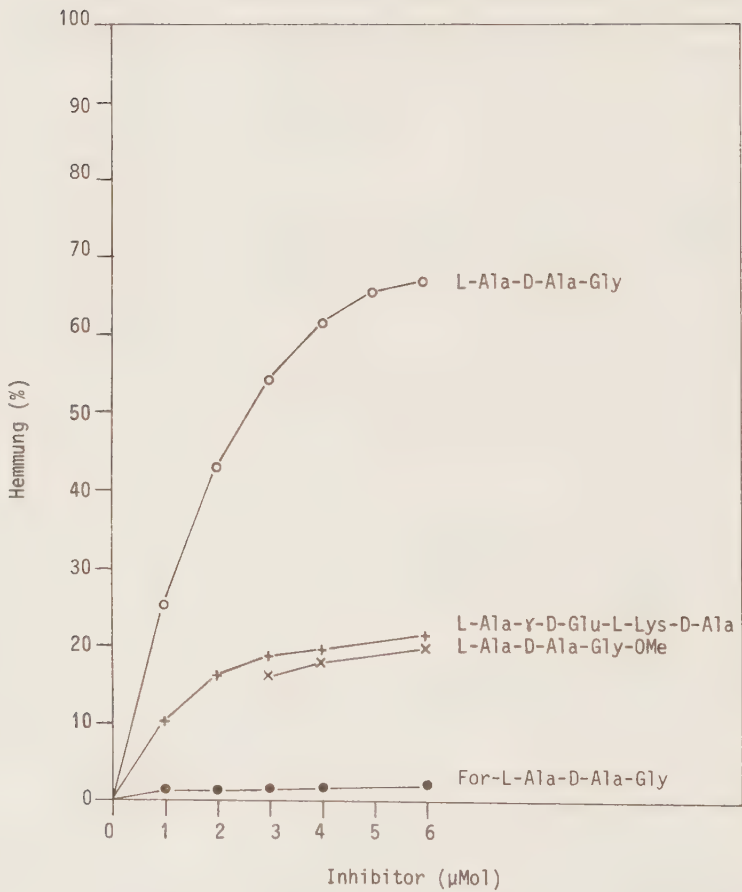


Abbildung 37. Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen *Micrococcus luteus* und (L-Ala₃-ε-Acp)₂₂-HSA. (o) L-Ala-D-Ala-Gly; (+) L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala; (x) L-Ala-D-Ala-Gly-OMe; (●) For-L-Ala-D-Ala-Gly;

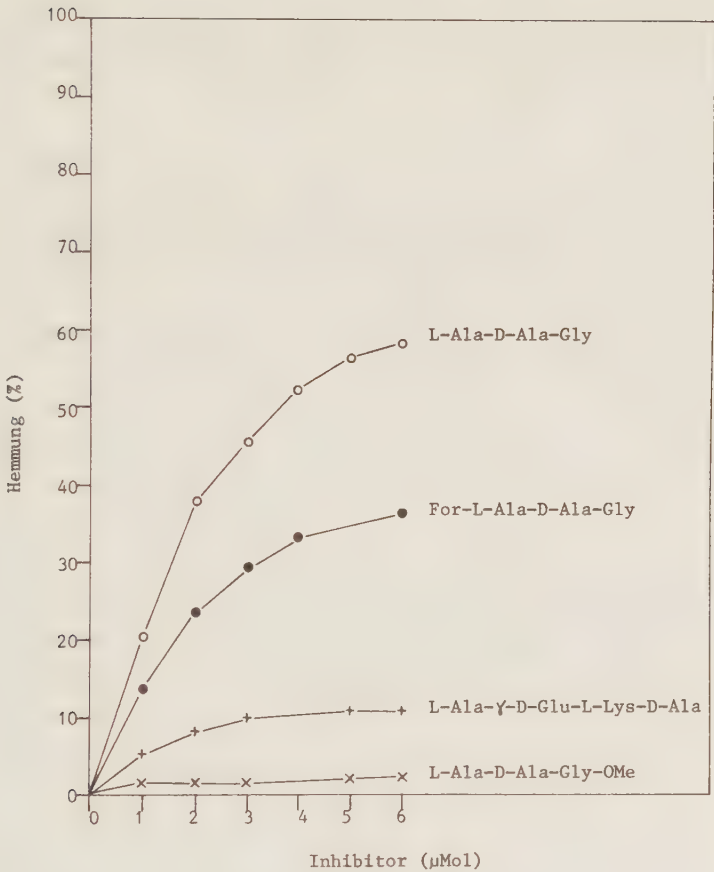


Abbildung 38. Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen Antiserum gegen Micrococcus luteus und HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁. (o) L-Ala-D-Ala-Gly; (●) For-L-Ala-D-Ala-Gly; (+) L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala; (x) L-Ala-D-Ala-Gly-OMe;

gen Micrococcus luteus und $(L-Ala_3-\epsilon-Acp)_{22}$ -HSA (Abbildung 37, Seite 159) sowie $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$ (Abbildung 38, Seite 160) soll die Spezifität der mit den jeweiligen Antigenen präzipitierbaren Antikörper näher charakterisieren.

Das Peptid $L-Ala-X-(\alpha-D-Glu-Gly)-L-Lys-D-Ala$ bildet die "Peptiduntereinheit" des Peptidoglycans von Mc. luteus. $L-Ala-D-Ala-Gly$, das der Sequenz $L-Ala-D-Glu-Gly$ sehr ähnelt, hemmt stark sowohl die Präzipitationsreaktion der Micrococcus luteus-Antiseren mit $(L-Ala_3-\epsilon-Acp)_{22}$ -HSA als auch diejenige mit $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$.

Eine Blockierung der Aminogruppe des Peptids $L-Ala-D-Ala-Gly$ durch Formylierung führt bei der Präzipitationsreaktion mit $(L-Ala_3-\epsilon-Acp)_{22}$ -HSA zu einem völligen Rückgang der Hemmwirkung, während diese Derivatisierung sich bei der Präzipitation mit $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$ zwar negativ auswirkt, das Peptid jedoch noch deutliche Hemmwirkung aufweist. Ein ähnliches Hemmverhalten wie $For-L-Ala-D-Ala-Gly$ zeigt D-Ala-D-Ala-Gly.

Die Maskierung der freien Carboxylgruppe von Glycin durch Methylierung wirkt sich dagegen bei der Präzipitation mit $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$ als Antigen sehr viel drastischer aus (keine Hemmung mit $L-Ala-D-Ala-Gly-OMe$!) als mit $(L-Ala_3-\epsilon-Acp)_{22}$ -HSA als Antigen. $L-Ala-D-Ala-Gly-OMe$ zeigt hier im Vergleich zu $L-Ala-D-Ala-Gly$ eine zwar verringerte, jedoch noch immer starke Hemmwirkung, die derjenigen von $L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala$ ähnelt.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

- Mit $(L-Ala_3-\epsilon-Acp)_{22}$ -HSA und mit $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$ wird aus den Antiseren gegen Micrococcus luteus wahrscheinlich dieselbe Antikörperpopulation präzipitiert.
- Der Bindungsbereich dieser Antikörperpopulation scheint sich auf die Sequenz $L-Ala-D-Glu-Gly$ zu erstrecken.

Diskussion

=====

Zahlreiche Arbeiten über die immunologischen Eigenschaften des Peptidoglycans charakterisieren eindeutig zwei antigene Determinanten:

1. Anteile des Glycanpolymers (27,29,57,102,118)
2. das Pentapeptid der Peptiduntereinheit (27,30,59,117,118,122,133, 171)

Neuere Untersuchungen deuteten an, daß gegen die Interpeptidbrücken Gram-positiver Kokken ebenfalls spezifische Antikörper gebildet werden (41,48,99). Diese Arbeiten enthalten Hinweise, daß bei Verwendung von Staphylococcus aureus als Antigen sowohl gegen Glycinpeptide mit freien Carboxylgruppen (41,99) als auch gegen Glycinpeptide mit freien N-Termini spezifische Antikörper gebildet werden (99). Diese Glycinpeptide mit freien N- und C-Termini in der Interpeptidbrücke von Staphylococcus aureus sind das Produkt einer Endopeptidase-Aktivität, die sich bei Staphylokokken häufig findet (16,143,144,158-160).

Antikörper mit Spezifität gegen die quervernetzende Interpeptidbrücke wären für eine serologische Differenzierung von Bakterien auf der Grundlage der Peptidoglycan-Primärstruktur besonders geeignet. Die Zusammensetzung und Sequenz der Interpeptidbrückenpeptide zeigt innerhalb der Gram-positiven Bakterien eine große Variation, sie ist jedoch meist innerhalb einzelner Gattungen oder Arten konstant. Der Peptidoglycantyp bildet deshalb als art- bzw. gattungsspezifische Eigenschaft ein ausgezeichnetes chemotaxonomisches Kriterium für die Klassifizierung der Gram-positiven Bakterien (119).

Der Versuch, solche "Interpeptidbrücken-spezifischen" Antikörper aus

Antiseren gegen Staphylokokken durch Affinitätschromatographie zu isolieren (41) führte zu unbefriedigenden Ergebnissen. Die Isolierung von Antikörpern mit Spezifität gegen die Interpeptidbrücke erwies sich als sehr arbeits- und zeitaufwendig. Darüber hinaus weist der überwiegende Anteil der gegen ganze Zellen gerichteten Antikörper Spezifität gegen die Teichonsäure (90), Zellwandproteine (30) sowie gegen den Glycansstrang (27,29,57,102,118) oder die Peptiduntereinheit des Peptidoglycans auf (27,30,41,59,117,118,122,133,171). Nur ein sehr kleiner Teil der gegen ganze Bakterienzellen gebildeten Antikörper zeigt Spezifität für die Interpeptidbrücke.

Die vorliegende Arbeit eliminiert diese Schwierigkeiten durch Verwendung synthetischer Antigene (122,133,171). Synthetische Analoga der Brückenpeptide von Staphylokokken ($-Gly_5$; Gly_5 - ϵ -Acp-) und von Mikrokokken ($L-Ala_3$ - ϵ -Acp-; " $L-Ala-Gly_4$ ") konjugierte man an Trägerproteine und induzierte so die Bildung spezifischer Antikörper gegen die für sich nicht immunogenen Peptide. Die Kopplung von Pentaglycin an HSA über die freien Aminogruppen des Peptids sollte zur Bildung von Antikörpern führen, die Spezifität gegen den C-terminalen Bereich der Pentaglycin-Determinanten besitzen. Dagegen sollten durch Bindung von Gly_5 - ϵ -Acp, $L-Ala_3$ - ϵ -Acp und $L-Ala-Gly_4$ über die Carboxylgruppen an die Trägerproteine Antikörper erhalten werden, die spezifisch gegen die freien N-Termini der Peptide gerichtet sind.

Die Immunisierung von Kaninchen mit dem synthetischen Antigen $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$ ergab hochtitrige Antiseren. Der Vergleich der quantitativen Präzipitationsreaktionen zwischen $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$ -Antiserum und $HSA-(CH_2CO-Gly_5)_{31}$, RNase- $(CH_2CO-Gly_5)_{11}$ bzw. HSA als Antigene zeigte, daß nur ca. 20 % des in der homologen Reaktion präzipitierbaren Antikörperproteins gegen das Trägerprotein HSA gerichtet sind. Ungefähr 80 % der Antikörper besitzen Spezifität für die eingeführten Peptid-Determinanten. Diese Antiseren sind hochspezifisch für Oligoglycinpeptide mit freien Carboxylgruppen. Oligo-L-Alaninpeptide (Brückenpeptide der meisten Mikrokokken und vieler Streptokokken) sowie das Tetra- und Pentapeptid der Peptiduntereinheit, $L-Ala-\gamma$ -D-Glu-L-Lys-D-Ala und $L-Ala-\gamma$ -D-Glu-L-Lys-D-Ala₂ binden nicht. Diese Schlußfolgerungen ließen

sich ableiten aus den Hapten-Hemmungen der quantitativen Präzipitationsreaktion zwischen HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiserum und dem homologen Antigen sowie aus dem Vergleich des positiven Präzipitationsverhaltens von RNase-(CH₂CO-Gly₅)₁₁ und der fehlenden Reaktion zwischen RNase-(CH₂CO-L-Ala₅)₉, RNase-(CH₂CO-Gly-L-Ala₂-D-Ala₂)₈, (Gly-ε-Acp)₁₀-RNase und Antiserum gegen HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁. Darüber hinaus bestätigt die Affinitätschromatographie an Pentaglycyl-Sepharose mit C-terminalem Glycin die hohe Spezifität der HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁-Antiseren für Oligoglycinpeptide mit freien C-Termini.

Diese "Anti-Pentaglycin-Carboxyl"-Antikörper präzipitierten bzw. agglutinierten sehr gut Staphylokokken-Peptidoglycane mit Pentaglycin- oder Oligoglycin, L-Serin-Interpeptidbrücken. Dagegen erhielten wir keinerlei Kreuzreaktionen mit Peptidoglycanen von Mikrokokken sowie mit anderen Bakteriengattungen oder -arten, denen Oligoglycinpeptide als Interpeptidbrücken fehlten.

Die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl"-Antikörper reagierten außer mit Peptidoglycanen des N⁶-(Gly₅₋₆)-L-Lys-Quervernetzungstyps ebenfalls sehr gut mit Peptidoglycanen mit N⁶-(Gly₄, L-Ser_{0.5-1.5})-L-Lys-Interpeptidbrücken. Diese Ergebnisse überraschten jedoch nicht. Untersuchungen von Tipper (151) zur Zusammensetzung der Gly₄, L-Ser-Interpeptidbrücke von Staphylococcus epidermidis Stamm Texas 26 (= Staphylococcus species CCM 2574) zeigten das Vorliegen von vier verschiedenen Brückenpeptiden bei diesem Stamm auf: Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, 20 %; Gly-Gly-L-Ser-Gly-Gly, 55 %; Gly-L-Ser-Gly-Gly-Gly, 10 %; L-Ser-Gly-L-Ser-Gly-Gly, 15 %. Darüber hinaus weisen bis zu 20 % der Brückenpeptide Glycinmoleküle mit freien Carboxylgruppen auf. Dennoch scheint sich die Substitution von Glycin durch L-Serin in der Interpeptidbrücke negativ auszuwirken. Peptidoglycane mit Oligoglycin, L-Serin-Interpeptidbrücken ergeben im Vergleich zu Peptidoglycanen mit Homo-Glycin-Brückenpeptiden bei gleichen Werten für C-terminales Glycin deutlich niedrigere Agglutinationen bzw. Präzipitationen. Diese verminderten Reaktionen der Peptidoglycane mit Gly₄, Ser_{0.5-1.5}-Brückenpeptiden stehen in Ein-

klang mit den Ergebnissen der Hapten-Hemmung. Die Peptide L-Ser-Gly, L-Ser-Gly-Gly und Gly-L-Ser-Gly binden zwar an die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl"-Antikörper, jedoch mit deutlich verminderter Affinität im Vergleich zu Diglycin oder Triglycin.

Die negative Präzipitation bzw. Agglutination der "Anti-Pentaglycin-Carboxyl"-Antikörper mit Peptidoglycanen von Staphylococcus haemolyticus und "Micrococcus roseus" CCM 168 erstaunte zunächst etwas. Die Oligoglycin, L-Alanin- bzw. Oligoglycin, L-Serin-Interpeptidbrücken dieser beiden Peptidoglycane ließen eine Wechselwirkung mit Antikörpern gegen HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ erwarten. Die quantitative Bestimmung C-terminalen Glycins zeigte auf, daß in diesen beiden Peptidoglycanen Glycinpeptide mit freien α -Carboxylgruppen für eine Bindung an die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl"-Antikörper nicht zur Verfügung stehen. Das Ausbleiben einer Reaktion mit Peptidoglycan von Staphylococcus haemolyticus und "Micrococcus roseus" CCM 168 bestätigte erneut die hohe Spezifität der Antiseren gegen Glycinpeptide mit freien α -Carboxylgruppen.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen in vollem Einklang mit Hinweisen, daß Antiseren gegen Staphylococcus aureus Antikörper mit Spezifität für Glycinpeptide mit freien Carboxylgruppen enthalten (41,99). In Zusammenarbeit mit A. Grov, Bergen, Norwegen, konnten wir ferner die Ergebnisse von Helgeland et al. (41) voll bestätigen. Helgeland konnte durch Immunaффinitätschromatographie von Staphylococcus aureus-Antiseren an Pentaglycyl-Sepharose mit C-terminalem Glycin eine Antikörperfraktion isolieren, die sich durch Pentaglycin wieder spezifisch von dem Immunadsorbens desorbieren ließ. Er zog daraus die Schlußfolgerung, daß Glycinpeptide mit freier Carboxylgruppe in der Interpeptidbrücke von Staphylokokken eine antigene Determinante des Peptidoglycans darstellen. Die Staphylokokken-Antiseren und die Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Serumfraktion Helgelands binden beide an unser Konjugat HSA-(CH₂-CO-Gly₅)₃₁; die Hapten-Hemmung zeigte, daß diese Wechselwirkung auf Grund der hohen Spezifität der Antikörper für Glycinpeptide mit freien Carboxylgruppen erfolgte.

Unsere Untersuchungen charakterisieren Glycinpeptide mit freien C-Termini in der Interpeptidbrücke von Staphylokokken als weitere antigene Determinante des Peptidoglycans. Neben dieser immunchemischen Aussage sollten die Antiseren gegen $\text{HSA}-(\text{CH}_2\text{CO-Gly}_5)_{31}$ den spezifischen Nachweis von Staphylokokken-Peptidoglycanen ermöglichen. Die $\text{HSA}-(\text{CH}_2\text{CO-Gly}_5)_{31}$ -Antiseren reagieren mit fast allen untersuchten Staphylokokken-Peptidoglycanen und zeigen mit Peptidoglycanen ohne Oligoglycin-Interpeptidbrücken keinerlei Präzipitation bzw. Agglutination. Dennoch scheinen die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl"-Antikörper sich für den serologischen Nachweis von Staphylokokken-Peptidoglycan weniger zu eignen. Das Ausbleiben einer Präzipitation bzw. Agglutination mit Staphylokokken-Peptidoglycan mit Oligoglycin-Brückenpeptiden ohne freie Carboxylgruppen des Glycins (z.B. Staphylococcus haemolyticus) schränkt die generelle Anwendungsmöglichkeit dieser Seren als Anti-Staphylokokken-Seren ein.

Unser Interesse verlagerte sich deshalb auf Antikörper mit Spezifität gegen den N-terminalen Bereich der Interpeptidbrückenpeptide. Solche spezifischen Antikörper schienen für den serologischen Nachweis von gattungs- bzw. artspezifischen Unterschieden in der Zusammensetzung der Brückenpeptide geeigneter. Die quantitative Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren des Peptidoglycans zeigte, daß ausnahmslos mindestens 15 % der Interpeptidbrückenpeptide nicht quervernetzt vorliegen, eine endständige Aminogruppe aufweisen und deshalb an spezifische Antikörper gegen den N-terminalen Bereich der Brückenpeptide binden sollten.

Durch Immunisierung von Kaninchen mit den Peptidyl-Proteinen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$, $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ und $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}\text{-RNase}$ erhielten wir hochtitrige Antiseren mit vorwiegender Spezifität gegen die Peptid-Determinanten. Nur ein kleiner Anteil der gegen die synthetischen Antigene gebildeten Antikörper reagierte spezifisch mit den Trägerproteinen. Diese Schlußfolgerungen ließen sich ziehen aus der vergleichen-

den Präzipitation der Antiseren mit den homologen Antigenen, den Trägerproteinen sowie synthetischen Antigenen mit homologen Peptid-Determinanten und heterologen Trägerproteinen.

Die Antiseren gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA wiesen eine enge Spezifität für den N-terminalen Bereich von Oligoglycinpeptiden auf (Gly₅-, Gly₄-, Gly₃-, Gly₂-; Brückenpeptide von Staphylokokken). Das Vorliegen einer freien Aminogruppe erwies sich als unbedingte Voraussetzung für eine Bindung der Antikörper an das Antigen. Im Hinblick auf die Anwendung der Antiseren zur serologischen Differenzierung zwischen verschiedenen Interpeptidbrücken war von besonderer Bedeutung, daß kürzere Glycinpeptide (Diglycin, Triglycin) ebenfalls spezifisch gebunden werden. Die Werte für C-terminales Glycin zeigten, daß bei Staphylokokken bis zu 20 % der Interpeptidbrücken auf Grund von Endopeptidaseaktivität (160) nicht als Pentapeptide sondern als kürzere Glycinpeptide vorliegen.

Die gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA gebildeten Antikörper zeigten keine Wechselwirkung mit Oligo-L-Alanin-Peptiden (L-Ala₄-, L-Ala₃-, L-Ala₂-; Interpeptidbrücken von Mikrokokken und Streptokokken) sowie mit L-Ala-Gly₄ (N-terminale Sequenz des für "Micrococcus roseus" CCM 168 und CCM 1405 charakteristischen Brückenpeptids). Die Antikörper ermöglichen auf Grund dieser Spezifität die eindeutige serologische Differenzierung zwischen den Sequenzen Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, L-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly sowie L-Ala-L-Ala-L-Ala. Die Peptide Gly₅ und L-Ala-Gly₄ unterscheiden sich strukturell nur durch eine einzige Methylgruppe!

Die bei Staphylokokken des N⁶-(Gly₄,L-Ser_{0.5-1.5})-L-Lys-Peptidoglycantyps auftretenden Peptidsequenzen Gly-Gly-L-Ser und Gly-L-Ser-Gly binden ebenfalls an die Antiseren gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-HSA, allerdings mit geringerer Affinität als Homoglycinpeptide. Ser-Gly-Gly dagegen bindet nicht. Dies beweist wiederum die hohe Spezifität der Antikörper für Glycinpeptide mit N-terminalem Glycin.

Die Antiseren gegen (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA besitzen hohe Spezifität für

den N-terminalen Bereich von Oligo-L-Alanin-Peptiden ($L-Ala_4$ -, $L-Ala_3$ -, $L-Ala_2$ -) und binden nicht an Oligo-Glycin-Peptide. Die Antikörper zeigen eine schwache Wechselwirkung mit Peptiden mit einem N-terminalen Alanin (z.B. $L-Ala-Gly_4$, $L-Ala-L-Thr$, $L-Ala-L-Ser$). Dies kann vermutlich durch Kreuzreaktion infolge von Strukturähnlichkeiten im N-terminalen Bereich der Peptide erklärt werden. Der N-terminale Bereich erwies sich für die Spezifität von ausschlaggebender Bedeutung. Peptide ohne N-terminales L-Alanin zeigten keinerlei Bindung an die Antikörper.

Die gegen $(L-Ala-Gly_4)_{11}$ -RNase gebildeten Antikörper weisen hohe Spezifität für die Sequenz $L-Ala-Gly_4$ - auf. Mit $L-Ala_3$ erhalten wir nur eine geringe Reaktion und Glycinpeptide binden nicht. Diese hohe Selektivität der Antikörper erlaubt wie mit den $(Gly_5-\xi-Acp)_{20}$ -HSA-Antisera die Differenzierung zwischen den Sequenzen Gly-Gly-Gly-Gly-Gly- und $L-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-$.

Die Peptide $L-Ala-\gamma-D-Glu-L-Lys-D-Ala$, $L-Ala-\gamma-D-Glu-L-Lys-D-Ala_2$ und $Gly-L-Ala_2-D-Ala_2$ binden nicht an die gegen $(Gly_5-\xi-Acp)_{20}$ -HSA gebildeten Antikörper; $Ac_2-L-Ala-\gamma-D-Glu-L-Lys-D-Ala$, $Ac_2-L-Ala-\gamma-D-Glu-L-Lys-D-Ala_2$, $Gly-\gamma-D-Glu-L-Lys-D-Ala_2$ oder $Gly-L-Ala_2-D-Ala_2$ weist keine Affinität für die $(L-Ala_3-\xi-Acp)_{22}$ -HSA-Antisera sowie für die $(L-Ala-Gly_4)_{11}$ -RNase-Antisera auf. Eine Wechselwirkung der gegen die synthetischen Peptidyl-Proteine gerichteten Antikörper mit dem Tetra- oder Pentapeptid der Peptiduntereinheit des Peptidoglycans konnte ausgeschlossen werden.

Die oben ausgeführten Schlußfolgerungen über die Spezifität der Antisera ließen sich aus den Hapten-Hemmungs-Reaktionen sowie aus den Präzipitationen der Antisera mit einer Reihe synthetischer Peptidyl-Protein-Antigene ableiten. Zusammenfassend können wir folgende Aussagen über die Spezifitäten der Antisera treffen:

Die Immunisierung mit den synthetischen Antigenen a) $(Gly_5-\xi-Acp)_{20}$ -HSA, b) $(L-Ala_3-\xi-Acp)_{22}$ -HSA und c) $(L-Ala-Gly_4)_{11}$ -RNase führte zu

Antiseren mit jeweils folgenden engbegrenzten Spezifitäten:

- a) N-terminaler Bereich von Oligo-Glycin-Peptiden
- b) N-terminaler Bereich von Oligo-L-Alanin-Peptiden
- c) N-terminaler Bereich der Sequenz L-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-.

Die Anwendung dieser Antiseren zur Unterscheidung strukturell verschiedener Interpeptidbrückenpeptide im Peptidoglycan untersuchten wir in der quantitativen Präzipitationsreaktion und in der Latex-Agglutination.

Ausnahmslos alle Staphylokokken-Peptidoglycane präzipitierten stark mit den Antiseren gegen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$ und agglutinierten mit Titern zwischen 1:256 und 1:1024. Starke Reaktionen erhielten wir nicht nur mit Peptidoglycanen mit Homo-Glycin-Interpeptidbrücken, sondern auch mit Peptidoglycanen des $(\text{Gly}_4, \text{L-Ser}_{0.5-1.5})\text{-L-Lys-Quervernetzungs-}$ typs. Dies läßt sich jedoch leicht erklären. Tipper (151) zeigte, daß Peptidoglycane mit Interpeptidbrücken der Zusammensetzung $\text{Gly}_4, \text{L-Ser}_{0.5-1.5}$ bis zu 20 % Pentaglycinbrücken aufweisen; darüber hinaus erhielten wir in der Hapten-Hemmung den Hinweis, daß die Sequenzen Gly-Gly-L-Ser- und Gly-L-Ser-Gly- von den Antikörpern ebenfalls spezifisch erkannt werden, allerdings mit geringerer Affinität gebunden werden. Dennoch scheint sich der Einbau von L-Serin in die Oligo-Glycin-Interpeptidbrücken auf die Höhe der Agglutinationstiter negativ auszuwirken. Von sieben untersuchten Peptidoglycanen des $\text{N}^6\text{-(Gly}_{5-6}\text{)-L-Lys-}$ Typs ergaben sechs Peptidoglycane Titer von 1:1024 und für eines erhielten wir 1:512 als Titer. Von den zehn getesteten Peptidoglycanen mit $\text{Gly}_4, \text{L-Ser}_{0.5-1.5}$ -Brückenpeptiden agglutinierten vier mit Titern von 1:512 und sechs mit Titern von 1:256.

Eine Abgrenzung von Peptidoglycanen mit Gly_{5-6} -Interpeptidbrücken von Peptidoglycanen mit $\text{Gly}_4, \text{L-Ser}_{0.5-1.5}$ -Brückenpeptiden erscheint mit den Antiseren gegen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$ jedoch nicht möglich.

Dagegen sollten sich Peptidoglycane mit Gly₅₋₆- sowie mit Gly₄,L-Ser_{0,5-1,5}-Interpeptidbrücken mit Hilfe von Antiseren gegen synthetische Antigene der Zusammensetzung (L-Ser-Gly-L-Ser-Gly-Gly)_n-Protein differenzieren lassen. Nach Tipper (151) weisen bei Staphylococcus epidermidis (Gly₄,L-Ser-Interpeptidbrücke) 15 % der Brückenpeptide die Struktur L-Ser-Gly-L-Ser-Gly-Gly auf.

Eine Veränderung im immunodominanten Bereich der Peptiddeterminanten läßt sich dagegen serologisch leicht nachweisen. Peptidoglycane mit L-Ala-Gly₆-Interpeptidbrücken ("Micrococcus roseus" CCM 168 und CCM 1405) zeigten mit den (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA-Antiseren keinerlei Reaktion! Dieses Ergebnis wurde bereits in der Haptenhemmung der homologen quantitativen Präzipitationsreaktion der Antiseren gegen (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA angedeutet: während bereits 4 µM Pentaglycin/mg Antikörperprotein die Präzipitationsreaktion zu 98 % hemmten, wies das Peptid L-Ala-Gly₄ keinerlei Hemmwirkung auf.

Diese hier erhaltenen Ergebnisse stehen in völliger Übereinstimmung mit der Literatur (15,53,103,104,107-109,117,118) und früheren eigenen Untersuchungen (122,132,133a,b). Eine Veränderung im immunodominanten Bereich der determinanten Gruppen von Antigenen hat auf die immunologische Reaktion gravierenden Einfluß. Sonstige Substitution in der antigenen Determinanten erwies sich in der Regel zwar als nachweisbar, sie wirkte sich jedoch nicht ausschlaggebend auf die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung aus.

Wir untersuchten in der Latex-Agglutination mit den (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA-Antiseren außer den bereits erwähnten Peptidoglycanen eine große Anzahl an Peptidoglycanen der verschiedensten Primärstrukturen. Alle getesteten Peptidoglycane ohne Oligoglycin-Interpeptidbrücken bzw. mit Brückenpeptiden ohne N-terminales Glycin ergaben mit den (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA-Antiseren keine Agglutination (z.B. Peptidoglycane mit L-Ala₃₋₄-, L-Ala₃-L-Thr-, L-Ala-L-Thr- sowie β-D-Asp(NH₂)-Brückenpeptiden oder Peptidoglycane des L-Lys-direkt und des meso-Dpm-direkt-Quer-

vernetzungsstyps). Diese Ergebnisse bestätigten erneut die bereits in der quantitativen Präzipitationsreaktion und in der Hapten-Hemmung gefundene Spezifität: $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{11}$ -RNase als Antigen präzipitierte die $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}$ -HSA-Antiseren nicht; Oligo-L-Alanin-Peptide, L-Ala-L-Thr und die Peptide der Peptiduntereinheit hemmten die homologe Präzipitation der $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}$ -HSA-Antiseren nicht.

Eine schwache Hemmwirkung wiesen dagegen Peptide der Sequenz Gly-L-Ala oder Gly-L-Thr auf. Diese Peptide bilden die Interpeptidbrücken einiger Streptokokken. In Übereinstimmung mit diesen Hemm-Ergebnissen zeigten die Peptidoglycane des $\text{N}^6\text{-(Gly-L-Thr)-L-Lys-}$ bzw. des $\text{N}^6\text{-(Gly-L-Ala)-L-Lys-}$ Quervernetzungsstyps mit den Antiseren gegen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}$ -HSA schwache Agglutination. Diese Bindung der $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}$ -HSA-Antiseren an Gly-L-Ala oder Gly-L-Thr läßt sich durch N-terminales Glycin sowohl in der Peptiddeterminanten von $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}$ -HSA als auch in den Interpeptidbrücken dieser Peptidoglycantypen erklären.

Die enge Spezifität der $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}$ -Antiseren für Oligo-L-Alanin-Peptide zeigte die Hapten-Hemmung der homologen quantitativen Präzipitationsreaktion. Weiter konnte in der quantitativen Präzipitation dieser Antiseren mit strukturell verschiedenen Peptidyl-Protein-Antigenen gezeigt werden, daß Glycin-Peptide oder Peptide ohne N-terminales L-Alanin an die Antiseren nicht binden. Die quantitative Präzipitation und die Latex-Agglutination der Antiseren mit Peptidoglycanen verschiedener Primärstrukturen bestätigte diese Ergebnisse über die Spezifität der Antiseren.

Alle Mikrokokken-Peptidoglycane mit L-Ala_{3-4} - und $\text{L-Ala}_3\text{-L-Thr-}$ Interpeptidbrücken agglutinierten mit den Antiseren gegen $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}$ -HSA mit Titern zwischen 1:512 und 1:2048. Die Streptokokken-Peptidoglycane mit Oligo-L-Alanin-Brückenpeptiden zeigten ebenfalls starke Agglutinationsreaktionen (Titer 1:256 bis 1:512). Alle Staphylokokken-Peptidoglycane dagegen sowie Peptidoglycane ohne Oligo-L-Alanin-Brük-

kenpeptide bzw. ohne Interpeptidbrücken mit N-terminalem L-Alanin ergaben in der Latex-Agglutination nur äußerst schwache Titer (bis 1:8) oder keine Reaktion. Es erstaunte zunächst etwas, daß die (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA-Antisera mit Peptidoglycanen ohne Oligo-L-Alanin-Interpeptidbrücken eine, wenn auch nur sehr schwache Agglutination zeigten. Die Bestimmung N-terminalen Alanins in den Peptidoglycanen brachte dann die Klärung.

N-Acetyl-muramyl-L-alanin-amidase-Aktivität kann im Peptidoglycan zu einer Spaltung der Bindung zwischen Muraminsäure und L-Alanin in Position 1 der Peptiduntereinheit führen und dabei L-Alaninmoleküle mit freien Aminogruppen freisetzen (zwei bis sechs Prozent). Diese Spuren N-terminalen Alanins werden von den Antikörpern spezifisch erkannt und ergeben die oben diskutierten Titer zwischen 1:2 und 1:8. Die Richtigkeit dieser These beweist die fehlende Agglutination mit Peptidoglycan ohne jegliches N-terminales L-Alanin (Microbacterium lacticum).

Einige Peptidoglycane weisen in ihren Interpeptidbrücken nur ein einziges N-terminales L-Alanin auf ("Micrococcus roseus" CCM 168 und CCM 1405, N⁶-(L-Ala-Gly₆)-L-Lys-Typ; Streptococcus mutans K. 25859 oder Streptococcus cremoris 316 a, N⁶-(L-Ala-L-Thr)-L-Lys-Typ). Die Antisera mit Spezifität gegen die Sequenz L-Ala₃- ϵ -Acp- zeigten eine schwache Agglutination mit diesen Peptidoglycanen. Diese partielle Reaktion läßt sich vermutlich auf das immunodominante L-Alanin sowohl in den Peptiddeterminanten von (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-HSA als auch in den Brückenpeptiden L-Ala-Gly₆ und L-Ala-L-Thr zurückführen.

Peptidoglycane von "Micrococcus roseus" CCM 168 und CCM 1405 mit L-Ala-Gly₆-Interpeptidbrücken ergaben mit den Antisera gegen die Sequenz Gly₅- ϵ -Acp- keinerlei Agglutination und mit Antisera gegen die Sequenz L-Ala₃- ϵ -Acp- nur schwache Agglutinationstiter. Mit Hilfe von Antikörpern gegen das synthetische Antigen (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase sollte nun geprüft werden, welche Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Interpeptidbrückenpeptide mit Hilfe spezifischer Antikörper serologisch noch feststellbar sind.

Die Antiseren gegen (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase zeigten keinerlei Reaktion mit allen Staphylokokken-Peptidoglycanen, agglutinierten jedoch mit Titern von 1:512 Peptidoglycane des N⁶-(L-Ala-Gly₆)-L-Lys-Typs. Dieses Ergebnis bestätigte die bereits in der Hapten-Hemmung festgestellte Spezifität der Antiseren. Oligo-Glycinpeptide (Gly₅, Gly₄) binden nicht an die Antikörper, während die Antiseren hohe Affinität für Peptide der N-terminalen Sequenz L-Ala-Gly-Gly- aufweisen. Die Antiseren gegen die synthetischen Antigene (Gly₅-ε-Acp)₂₀-HSA und (L-Ala-Gly₄)₁₁-RNase erlauben eindeutig die serologische Differenzierung von Peptidoglycanen mit Oligo-Glycin- bzw. mit L-Ala-Gly₆-Interpeptidbrückenpeptiden.

In der vorliegenden Arbeit sollte unter Einsatz synthetischer Antigene die serologische Differenzierung von Gram-positiven Bakterien auf der Grundlage der Zusammensetzung ihrer Peptidoglycantypen versucht werden. Die Sequenz der Interpeptidbrückenpeptide des Peptidoglycans stellt, wie bereits mehrmals erwähnt, ein wichtiges chemotaxonomisches Merkmal dar (119).

Die oben diskutierten Ergebnisse der Latex-Agglutination zwischen Antiseren gegen die synthetischen Antigene und Peptidoglycanen verschiedener Primärstrukturen zeigten, daß Antiseren gegen synthetische Peptidyl-Proteine die serologische Differenzierung verschiedener Peptidoglycantypen erlauben. Zur Bestimmung des Peptidoglycantyps an ganzen Bakterienzellen wurde ein Schnelltest erarbeitet. Die Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin oder Trypsin/Trichloressigsäure von anderen Zellwandbestandteilen, die eine Bindung der "Anti-Interpeptidbrücken-Antikörper" behindern, befreit. Nach dieser Vorbehandlung der Zellen ließen sich die Peptidoglycantypen ausnahmslos eindeutig nachweisen (Titer von 1:32 bis 1:128 bei positiver Reaktion; Titer von 0 oder 1:2 in der negativen Kontrolle). Der Bedarf an Bakterienmaterial erwies sich als gering. Für die Durchführung des Tests genügten 10 ml

einer über Nacht gewachsenen Kultur. Das Ergebnis der serologischen Differenzierung ließ sich nach ca. drei Stunden ablesen. Die Nachweisgrenze lag bei 10 ng Peptidoglycan, dies entspricht ungefähr 10^5 Bakterien/ml.

Zusammenfassend soll die serologische Unterscheidung Gram-positiver Bakterien auf der Grundlage des Peptidoglycantyps am Beispiel der Differenzierung zwischen Staphylokokken und Mikrokokken dargestellt werden (Tabelle 28).

Tabelle 28. Serologische Differenzierung zwischen Staphylokokken und Mikrokokken mit Hilfe von Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$ und $(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$

	Agglutination mit Antiserum gegen	
	$(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$	$(\text{L-Ala}_3\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$
<u>Staphylokokken</u>		
$\text{Gly}_5\text{-6}^-$, $\text{Gly}_4\text{-L-Ala-}$, $\text{Gly}_4\text{-L-Ser}_{0.5-1.5}^-$ Brückenpeptide	++++	-
<u>Mikrokokken</u>		
$\text{L-Ala}_3\text{-4}^-$, $\text{L-Ala}_3\text{-}$ $\text{L-Thr-Brückenpeptide}$	-	++++
<u>Bacillus subtilis</u>		
meso-Dpm-direkt-Typ	-	-

Die Unterscheidung der Gattungen Staphylococcus und Micrococcus durch den klassischen Oxidativ-Fermentativ-Test führte zu Fehldeutungen (125). Tabelle 28, Seite 174, zeigt, daß die Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine $(\text{Gly}_5\text{-}\mathcal{E}\text{-Acp})_{20}\text{-HSA}$ und $(\text{L-Ala}_3\text{-}\mathcal{E}\text{-Acp})_{22}\text{-HSA}$ dagegen eine klare Differenzierung zwischen den beiden Gattungen ermöglichen.

Neben einer serologischen Differenzierung verschiedener Peptidoglycantypen erlaubten die Peptidyl-Protein-Antigene ebenfalls die eindeutige Charakterisierung der Interpeptidbrücke als weitere antigene Determinante des Peptidoglycans. Hapten-Hemmungen zeigten (117), daß in der Präzipitationsreaktion von Antiseren gegen ganze Bakterienzellen mit Peptidoglycan als Antigen Antikörper gegen die Interpeptidbrücke kaum zu erfassen sind. Die spezifische Präzipitation von Interpeptidbrücken-Antikörpern mit den synthetischen Peptidyl-Proteinen als Antigene ermöglichte dagegen den eindeutigen Nachweis der Interpeptidbrücke als weitere antigene Determinante des Peptidoglycans. Folgende determinante Gruppen ließen sich charakterisieren:

Staphylococcus aureus

Glycinpeptide mit freien C-Termini und Glycinpeptide mit freien N-Termini. Die Hinweise von Helgeland et al. (41) und Ranu (99) zur Spezifität von Antikörpern gegen die Interpeptidbrücke in Antiseren gegen S. aureus ließen sich voll bestätigen.

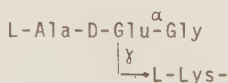
Streptococcus A-variant

$\text{N}^6\text{-(L-Ala-L-Ala-L-Lys- und N}^6\text{-(L-Ala-L-Ala-L-Ala)-L-Lys-Peptide mit L-Alanin-molekülen mit freien N-Termini.}$ Die negativen Ergebnisse der Präzipitation der Antiseren mit $\text{HSA-(CH}_2\text{CO-L-Ala}_5\text{)}_{29}$ deuteten an, daß gegen L-Alaninpeptide mit freien Carboxylgruppen vermutlich keine spezifischen Antikörper gebildet werden.

Micrococcus luteus

Die polymerisierte Peptiduntereinheit mit freiem N-terminalem L-Alanin.

Die Antikörper sind sehr wahrscheinlich gegen N-terminales L-Alanin und gegen C-terminales Glycin gerichtet:



Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Methode zur serologischen Differenzierung Gram-positiver Bakterien mit Hilfe von Antiseren gegen synthetische Antigene scheint prinzipiell auf alle Peptidoglycantypen anwendbar. Soweit bis heute bekannt ist, weisen ausnahmslos alle Interpeptidbrückenpeptide zu mindestens 15 Prozent freie N-Termini auf. Spezifische Antikörper gegen den N-terminalen Bereich der Brückenpeptide sollten deshalb an die Interpeptidbrücken mit freien Aminogruppen binden können. Von besonderem Interesse für zukünftige Synthesen wären der $\text{N}^6\text{-(D-Asp(NH}_2\text{))}$ -L-Lys-Typ (Streptokokken, Laktobazillen (119)) sowie die serologische Differenzierung der zahlreichen, innerhalb der Coryneformen Organismen vorkommenden Peptidoglycantypen (119).

V. Zusammenfassung

=====

1. Eine in der Literatur beschriebene Kontroverse zur Spezifität der gegen den Glycanstrang des Peptidoglycans gerichteten Antikörper konnte geklärt werden. Die spezifische Abtrennung von Antikörpern gegen das Pentapeptid der Peptiduntereinheit, die Anwendung geeigneterer Methoden zur Extraktion von Teichonsäuren und/oder Polysacchariden sowie die Auswahl entsprechender Antigene (z.B. Chitin oder Peptidoglycan von B. subtilis), die als einzige gemeinsame antigene Determinante mit den zur Immunisierung verwendeten Bakterien das Glycanpolymer aufweisen, erlaubte erstmals die isolierte Untersuchung der "Glycanstrang-Antikörper" ohne störenden Einfluß anderer spezifischer Antikörper.

Peptidoglycan-Antiseren verschiedener Bakteriengattungen präzipitierten mit einer Reihe strukturell unterschiedlicher Peptidoglycane sowie mit Chitin als Antigen. Die Spezifität der mit den jeweiligen Antigenen präzipitierbaren Antikörperpopulationen wurde in der Hapten-Hemmung mit einer Reihe isolierter bzw. synthetisierter Zucker oder Zuckerderivate (z.B. Acetyl-Chitosaccharide, Oligosaccharide aus dem Glycanstrang des Peptidoglycans, freie und Carboxyl-substituierte Acetyl-Muraminsäure) untersucht.

Diese Untersuchungen charakterisierten den Glycanstrang des Peptidoglycans als antigene Determinante mit N-Acetyl-D-Glucosamin als immunodominanten Zucker. Darüber hinaus enthalten Antiseren gegen Micrococcus luteus eine Antikörperpopulation, die spezifisch gegen N-Acetyl-D-Muraminsäure mit freier Carboxylgruppe gerichtet ist. Solche nicht peptid-substituierten Acetyl-Muraminsäuremoleküle finden sich als weitere antigene Determinante bei einigen wenigen Bakterienarten (z.B. Mc. lygae).

Die immunochemische und diagnostische Bedeutung der gegen den Gly-

canstrang des Peptidoglycans gerichteten Antikörper wird diskutiert.

2. Frühere Untersuchungen an Antiseren gegen Staphylococcus aureus deuteten auf das Vorkommen von spezifischen Antikörpern gegen Glycinpeptide mit freien C-Termini in der Interpeptidbrücke hin. Wir synthetisierten deshalb ein Protein-Peptid-Konjugat, das Pentaglycinpeptide mit freien Carboxylgruppen als determinante Gruppen aufweist. Durch Immunisierung von Kaninchen mit diesem synthetischen Antigen erhielten wir Antiseren mit vorwiegender Spezifität gegen die eingeführten Peptidketten. Die quantitative Präzipitationsreaktion mit einer Reihe synthetischer Peptidyl-Protein-Antigene, die Immunaффinitätschromatographie der Antiseren an Sepharose-(Gly₅)_n und die Hapten-Hemmung mit verschiedenen synthetischen Peptiden und Peptidderivaten zeigten die hohe Spezifität der Antiseren für Oligoglycinpeptide mit freien Carboxylgruppen. Diese "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" präzipitierten bzw. agglutinierten sehr gut Staphylokokken-Peptidoglycane mit Pentaglycin- oder mit Oligoglycin, L-Serin-Interpeptidbrücken, zeigten dagegen keinerlei Reaktion mit Peptidoglycanen ohne Oligoglycinbrücken (z.B. Peptidoglycane von B. subtilis, Mc. varians, Str. pyogenes). Die Hapten-Hemmung der quantitativen Präzipitation zwischen "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörpern" und Peptidoglycan von S. aureus lieferte einen weiteren Beweis für identische determinante Gruppen des synthetischen Antigens HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁ und von Staphylokokken-Peptidoglycan.

Antiseren gegen Staphylococcus aureus ergaben ebenfalls eine starke spezifische Reaktion mit dem Konjugat HSA-(CH₂CO-Gly₅)₃₁. Oligoglycinpeptide mit freien Carboxylgruppen in der Interpeptidbrücke von Staphylokokken konnten dadurch als weitere antigene Determinante des Peptidoglycans nachgewiesen werden.

Für ein schnelles serologisches "Screening" verschiedener Peptidoglycane wurde ein Latex-Agglutinationstest ausgearbeitet. Gereinigte "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" (IgG-Fraktion des Antiserums) adsorbierte man an Latex-Partikeln und bestimmte dann mit

den verschiedenen Peptidoglycanen die Agglutinationstiter. Die Nachweisgrenze lag bei 10 Nanogramm Peptidoglycan.

Peptidoglycane mit Oligoglycin-Interpeptidbrücken ohne freie Carboxylgruppen von Glycin (z.B. S. haemolyticus) binden nicht an die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper". Aus diesem Grund scheinen die "Anti-Pentaglycin-Carboxyl-Antikörper" für den generellen serologischen Nachweis von Staphylokokken-Peptidoglycan weniger geeignet.

3. Spezifische Antiseren gegen den N-terminalen Bereich der Interpeptidbrückenpeptide erschienen für eine serologische Differenzierung von Bakterien auf der Grundlage des Peptidoglycantyps erfolgversprechender. Die synthetisierten Peptide Gly₅- ϵ -Acp bzw. L-Ala- ϵ -Acp (strukturelle Ähnlichkeit zu den Interpeptidbrückenpeptiden von Staphylokokken bzw. vieler Mikrokokken) wurden deshalb an Trägerproteine gekoppelt (freie Aminogruppen der eingeführten Peptidketten) und mit den erhaltenen synthetischen Immunogenen Kaninchen immunisiert. Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine wiesen einen hohen Anteil an Antikörpern auf, die spezifisch gegen den N-terminalen Bereich der eingeführten Peptidketten gerichtet waren. Antiseren gegen (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-Albumin ergaben starke Präzipitationen und hohe Agglutinationstiter mit allen Staphylokokken-Peptidoglycanen. Die (Gly₅- ϵ -Acp)₂₀-Albumin-Antiseren zeigten jedoch keine Reaktion mit Peptidoglycanen von Mikrokokken oder anderen Bakterien, denen diese für Staphylokokken typischen Oligoglycin-Peptide fehlen. Antiseren gegen (L-Ala₃- ϵ -Acp)₂₂-Albumin präzipitierten bzw. agglutinierten dagegen sehr gut Peptidoglycane mit Oligo-L-Alanin-Interpeptidbrücken (z.B. Mc. varians, Mc. roseus, Str. pyogenes), zeigten jedoch keine nennenswerten Reaktionen mit Peptidoglycan von Staphylokokken oder anderen Bakterien ohne Oligo-L-Alanin-Interpeptidbrücken.

Da die Anwendung dieser Antiseren zur serologischen Differenzierung intakter Bakterienzellen im Gegensatz zu isolierten Peptidoglycanen sehr schwache Titer in der Latex-Agglutination ergab, wurde eine Schnellextraktion der Zellen ausgearbeitet. Die Bakterien wurden 30

Minuten bei 100°C mit Trichloressigsäure und eine Stunde mit Trypsin inkubiert, und dann die Titer in der Latex-Agglutination bestimmt. Der beschriebene Test zur serologischen Differenzierung von Bakterien auf der Grundlage ihrer Peptidoglycantypen benötigt 10 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei 10^6 - 10^7 Zellen/ml. Staphylokokken lassen sich ohne vorhergehenden Reinigungsschritt in einer Mischkultur spezifisch nachweisen. Vergleichende Untersuchungen mit Antiseren gegen $(\text{Gly}_5\text{-}\epsilon\text{-Acp})_{20}$ -Albumin und mit $(\text{L-Ala-Gly}_4)_{11}$ -RNase-Antiseren zeigten die hohe Spezifität der Antikörper auf. Mit Hilfe der Antiseren gegen die Peptidyl-Proteine läßt sich der Austausch einer Aminosäure (Glycin und L-Alanin) in der Interpeptidbrücke eindeutig serologisch nachweisen.

Die Präzipitationsreaktionen zwischen Antiseren gegen intakte Bakterienzellen und den synthetischen Peptidyl-Proteinen wurden ebenfalls untersucht. Die Präzipitations- und die Hapten-Hemmungsreaktionen charakterisierten Oligoglycinpeptide bei S. aureus und Oligo-L-Alaninpeptide bei Str. pyogenes mit freien Aminogruppen als weitere antigene Determinanten des Peptidoglycans.

VI Literaturverzeichnis

=====

- (1) Abdulla, E.M. und Schwab, J.H. (1965): Immunological properties of bacterial cell wall mucopeptide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118, 359-362.
- (2) Anderson, G.W. und McGregor, A. (1957): t-Butyloxycarbonyl-amino acids and their use in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 6180-6183.
- (3) Adam, A., Petit, J.F., Wietzerbin-Falszpan, J., Sinay, P., Thomas, D.W. und Lederer, E. (1969): L'acide N-glycolylmuramique, constituant des parois de *Mycobacterium smegmatis*: identification par spectrometrie de masse. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 4, 87-92.
- (4) Anderson, G.W., Zimmermann, J.E. und Callahan, F.M. (1964): The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1839-1842.
- (5) Anfinsen, C.B., Sela, M. und Cooke, J.P. (1962): The reversible reduction of disulfide bonds in polyalanyl ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 237, 1825-1831.
- (6) Araki, Y., Nakatani, T., Hayashi, H. und Ito, E. (1971): Occurrence of non-N-substituted glucosamine residues in lysozyme resistant peptidoglycan from *Bacillus cereus* cell walls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 691-697.
- (7) Archibald, A.R., Baddiley, J. und Goundry, J. (1970): The action of dilute alkali on the glycol residues of staphylococcal peptidoglycan. *Biochem. J.* 116, 313-315.
- (8) Ashwell, G. (1957): Colorimetric analysis of sugars. *Meth. Enzymol.* 3, 73-97.
- (9) Baird-Parker, A.C. (1974): *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Eighth edition, The Williams and Wilkins Company/ Baltimore. S. 479.
- (10) Bergmann, M. und Zervas, L. (1932): Über ein allgemeines Verfahren der Peptidsynthese. *Chem. Ber.* 65, 1192-1200.
- (11) Behringwerke AG. (1971): Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik. Heft 3, Juli 1971. Firmenschrift.
- (12) Bogdanov, I.G., Dalev, P.G., Gurevich, A.I., Kolosov, M.N., Malikova, V.P., Plemnyannikova, L.A. und Sorokina, I.B. (1975): Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS letters*, 57, 259-261.
- (13) Chedid, L., Lamensans, A., Parant, F., Parant, M., Adam, A., Pe-

- tit, J.F. und Lederer, E. (1973): Protective effect of delipidated mycobacterial cells and purified cell walls against Ehrlich carcinoma and a syngeneic lymphoid leukemia in mice. *Cancer Res.* 33, 2187.
- (14) Cuatrecasas, P. (1970): Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J. Biol. Chem.* 245, 3059-3065.
- (15) Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. und Wood, B. Jr. (1973): *Microbiology*. Harper & Row, Publishers, Hagerstown, Maryland, New York, Evanston, San Francisco, London. S. 728-738.
- (16) Doughty, C.C. und Mann, J.A. (1967): Purification and properties of a bacteriophage-induced cell wall peptidase from Staphylococcus aureus. *J. Bact.* 93, 1089-1095.
- (17) Drews, G. (1968): *Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. S. 146.
- (18) Engvall, E. und Perlmann, P. (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.* 109, 129-135.
- (19) Fraenkel-Conrat, H. und Chung Ming Tsung (1967): Hydrazinolysis. *Meth. Enzymol.* 11, 151-155.
- (20) Gattermann, L: (1962): *Die Praxis des organischen Chemikers*. Walter de Gruyter & Co. Berlin.
- (21) Ghuysen, J.M. und Strominger, J.L. (1963): Structure of the cell wall of Staphylococcus aureus, strain Copenhagen. I. Preparation of fragments by enzymatic hydrolysis. *Biochem.* 2, 1110-1119.
- (22) Ghuysen, J.M. und Strominger, J.L. (1963): Structure of the cell wall of Staphylococcus aureus, strain Copenhagen. II. Separation and structure of disaccharides. *Biochem.* 2, 1119-1125.
- (23) Ghuysen, J.M., Tipper, D.J., Birge, C.H., und Strominger, J.L. (1965): Structure of the cell wall of Staphylococcus aureus, strain Copenhagen. VI. The soluble glycopeptide and its sequential degradation by peptidases. *Biochem.* 4, 2244-2254.
- (24) Ghuysen, J.M., Tipper, D.J. und Strominger, J.L. (1966): Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Meth. Enzymol.* 8, 685-699.
- (25) Ghuysen, J.M., Bricas, E., Ley-Bouille, M., Lache, M., und Shockman, G.D. (1967): The peptide N-(L-alanyl-D-isoglutaminyl)-N-(D-isoasparaginyl-β-1,4-N-acetylmuramic acid) in cell wall peptidoglycan of Streptococcus faecalis strain ATCC 9790. *Biochem.* 6, 2607-2719.
- (26) Ghuysen, J.M. (1968): Use of bacteriolytic enzymes in determina-

tion of cell wall structure and their role in cell metabolism. Bact. Rev. 32, 425-464.

- (27) Goldstein, I., Caravano, R. und Parlebas, J. (1973): Immunochemical study of group A Streptococcus peptidoglycan solubilized by 8 M urea. J. Immunol. 110, 1667-1671.
- (28) Greenstein, J.P. und Winitz, M. (1961): Chemistry of the amino acids. John Wiley and sons, Inc., New York, London, Sidney.
- (29) Grov, A. (1969): Studies on antigen preparations from Staphylococcus aureus. 7. The component of polysaccharide A sensitizing tanned erythrocytes. Acta path. microbiol. scand. 76, 621-629.
- (30) Grov, A. (1969): Studies on antigen preparations from Staphylococcus aureus. 8. The substance of crude protein A sensitizing tanned erythrocytes. Acta path. microbiol. scand. 76, 629-636.
- (31) Grov, A. unveröffentlicht.
- (32) Guinand, M., Vacheron, M.J. und Michel, G. (1970): Structure de parois cellulaires des Nocardia. I. Isolement et composition des parois de Nocardia kirovani. Fed. Biochem. Soc. Lett. 6, 37-39.
- (33) Hagenmaier, H. und Frank, H. (1972): increased coupling yields in Solid Phase Peptide Synthesis with a modified carbodiimide coupling procedure. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1973-1976.
- (34) Hahn, G., Heeschen, W. und Tolle, A. (1970): Streptococcus. Eine Studie zur Struktur, Biochemie, Kultur und Klassifizierung. Kieler Milchw. Forschungsber. 22, Heft 4.
- (35) Haimovich, J., Schechter, I. und Sela, M. (1969): Combining sites of IgG and IgM antibodies of poly-D-alanyl specificity. Eur. J. Biochem. 7, 537-543.
- (36) Halpern, B., Fray, A., Crepin, Y., Platica, O., Lorinet, A.M., Rabourdin, A., Sparros, L. und Isac, R. (1973): Corynebacterium parvum, a potent immunostimulant in experimental infections and in malignancies. In: Immunopotential, Ciba Foundation Symposium 18 (new series) p. 217. Amsterdam-London-New York. Associated Scientific Publishers, Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland.
- (37) Hammes, W. (1972): Die Wirkung von Glycin auf die Biosynthese des Mureins. Dissertation, TU München.
- (38) Hammes, W. (1976): Biosynthesis of peptidoglycan in Gaffkya homari. The mode of action of Penicillin G and Methicillinam. Eur. J. Biochem. 70, 107-113.
- (39) Hammes, W. und Kandler, O. (1976): Biosynthesis of peptidoglycan in Gaffkya homari. The incorporation of peptidoglycan into

- the cell wall and the direction of transpeptidation. Eur. J. Biochem. 70, 97-106.
- (40) Hartree, E.F. (1972): Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48, 422-427.
 - (41) Helgeland, S.M., Grov, A. und Schleifer, K.H. (1973): The immunochemistry of Staphylococcus aureus mucopeptide. Acta path. microbiol. scand., Sec. B; 81, 413-418.
 - (42) Heymann, H., Manniello, J.M. und Barkulis, S.S. (1963): Structure of streptococcal cell walls. I. Methylation study of C-polysaccharide. J. Biol. Chem. 238, 502.
 - (43) Heymer, B., Schachenmayr, W., Bültmann, B., Spanel, R., Haferkamp, O. und Schmidt, W.C. (1973): A latex agglutination test for measuring antibodies to streptococcal mucopeptides. J. Immunol. 111, 478-484.
 - (44) Heymer, B. (1975): Biologische Aktivität bakterieller Peptidoglycane (Mureine). Klin. Wschr. 53, 49-57.
 - (45) Heymer, B., Schleifer, K.H., Read, S., Zabriskie, J.B. und Krause, R.M. (1976): Detection of antibodies to bacterial cell wall peptidoglycan in human sera. J. Immunol. 117, 23-26.
 - (46) Hirs, C.H.W. (1967): Detection of peptides by chemical methods. Meth. Enzymol. 11, 325-329.
 - (47) Hisatsune, K., De Courcy, S.J. und Mudd, S. (1967): Studies on the carbohydrate-peptide fraction of the centrifugal supernatants of Staphylococcus aureus cultures. Biochem. 6, 586-594.
 - (48) Hisatsune, K., De Courcy, S.J. und Mudd, S. (1967) The immunologically active cell wall peptide polymer of Staphylococcus aureus. Biochem. 6, 595-603.
 - (49) Hladny, J. (1971): Mureintypen und deren taxonomische Bedeutung bei Streptokokken. Dissertation, TU München.
 - (50) Hughes, R.C., Thurman, P.F. und Salaman, M.R. (1971): Antigenic properties of Bacillus licheniformis cell wall components. Eur. J. Biochem. 19, 1-8.
 - (51) IUPAC-IUB commission on Biochemical nomenclature symbols for amino acid derivatives and peptides. Recommendations (1971). Biochem. 11, 1726-1732.
 - (52) Jeuniaux, M. (1966): Complex Carbohydrates. Meth. Enzymol. 8, 646.
 - (53) Kabat, E.A. (1971): Einführung in die Immunchemie und Immunologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
 - (54) Kandler, O., Schleifer, K.H. und Dandl, R. (1968): Differentiation of Streptococcus faecalis Andrewes and Horder and Streptococcus faecium Orla-Jensen based on the amino acid composition of their murein. J. Bact. 96, 1935-1939.

- (55) Karakawa, W.W., Lackland, H. und Krause, R.M. (1966): An immunochemical analysis of bacterial mucopeptides. J. Immunol. 97, 797-804.
- (56) Karakawa, W.W. und Krause, R.M. (1966): Studies on the immunochemistry of streptococcal mucopeptide. J. Exp. Med. 124, 155-171.
- (57) Karakawa, W.W., Lackland, H. und Krause, R.M. (1967): Antigenic properties of the hexosamine polymer of streptococcal mucopeptides. J. Immunol. 99, 1179-1182.
- (58) Karakawa, W.W., Braun, D.G., Lackland, H. und Krause, R.M. (1968): Immunochemical studies on the cross-reactivity between streptococcal and staphylococcal mucopeptide. J. Exp. Med. 128, 325-340.
- (59) Karakawa, W.W., Maurer, P.H., Walsh, P. und Krause, R.M. (1970): The role of D-alanine in the antigenic specificity of bacterial mucopeptides. J. Immunol. 104, 230-237.
- (60) Kloos, W.E., Tornabene, T.G. und Schleifer, K.H. (1974): Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: Micrococcus lylae and Micrococcus kristinae. Int. J. Syst. Bact. 24, 79-101.
- (61) Kloos, W.E. und Schleifer, K.H. (1975): Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis, Staphylococcus hominis and Staphylococcus simulans. Int. J. Syst. Bact. 25, 62-79.
- (62) Kloos, W.E., Schleifer, K.H. und Smith, R.F. (1976): Characterization of Staphylococcus sciuri sp. nov. and its subspecies. Int. J. Syst. Bact. 26, 22-37.
- (63) Knox, K.W. und Wicken, A.J. (1973): Immunological properties of teichoic acids. Bact. Rev. 37, 215-257.
- (64) Kocur, M., Bergan, T. und Mortensen, N. (1971): DNA base composition of gram-positive cocci. J. Gen. Microbiol. 69, 167-183.
- (65) Kocur, M., Schleifer, K.H. und Kloos, W.E. (1975): Taxonomic status of Micrococcus nishinomiyaensis Oda 1935. Int. J. Syst. Bact. 25, 290-293.
- (66) Kocur, M. und Schleifer, K.H. (1975): Taxonomic status of Micrococcus agilis Ali-Cohen 1889. Int. J. Syst. Bact. 25, 294-297.
- (67) Krulwich, T.A., Ensign, J.C., Tipper, D.J. und Strominger, J.L. (1967): Sphere-rod morphogenesis on Arthrobacter crystallopoietes. I. Cell wall composition and polysaccharides of the peptidoglycans. J. Bact. 94, 734-740.
- (68) Krulwich, T.A., Ensign, D.J., Tipper, J.C. und Strominger, J.L.

- (1967): Sphere-rod morphogenesis in *Arthrobacter crystallopoietes*. II. Peptides of the cell wall peptidoglycan. J. Bact. 94, 741-750.
- (69) Lancefield, R.D. (1938): A microprecipitin-technique for classifying hemolytic streptococci and improved methods for producing antisera. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 38, 473.
- (70) Larson, D.M., Snetsinger, D.C. und Waibel, P.E. (1971): Procedure for determination of D-amino acids. Anal. Biochem. 39, 395-401.
- (71) Lederberg, J. (1957): Mechanism of action of penicillin. J. Bact. 73, 144.
- (72) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- (73) Mathé, G. (1973): Attempt at using systemic immunity adjuvants in experimental and human cancer therapy. In: Immunopotential. Ciba Foundation Symposium 18 (new series); p. 305. Amsterdam/London/New York. Elsevier, Excerpta Medica-North-Holland.
- (74) McCarthy, M. und Morse, S.L. (1971): The streptococcal cell wall. In: The Harvey lectures, Series 65, New York; Academic Press.
- (75) Merck, E. (1970): Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie. Firmenschrift Merck, Darmstadt.
- (76) Merck, E. (1971): Trocknen im Labor. Firmenschrift Merck, Darmstadt.
- (77) Merrifield, R.B. (1963): Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154.
- (78) Merrifield, R.B. (1964): Solid phase peptide synthesis. III. An improved synthesis of bradykinin. Biochem. 3, 1385-1390.
- (79) Merrifield, R.B. und Corrigliano, M.A. (1968): Glycyl-L-aspartyl-L-seryl-glycine. Biochem. Prep. 12, 98-103.
- (80) Merrifield, R.B. (1969): Solid phase peptide synthesis. Adv. Enzymol. 32, 221-296.
- (81) Mirelman, D. (1975): persönliche Mitteilung.
- (82) Mortensen, N. und Kocur, M. (1967): Correlation of DNA base composition and acid formation from glucose from staphylococci and micrococci. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 69, 445-457.
- (83) Mühlradt, P.F., Menzel, J., Colecki, J.R. und Speth, V. (1973): Outer membrane of *Salmonella*. Sites of Export of newly synthesized Lipopolysaccharide on the bacterial surface.
- (84) Muñoz, E., Ghuyssen, J.M., Leyh-Bouille, M., Petit, J.F., Hey-

- mann, H., Bricas, E. und Lefrancier, P. (1966): The peptide-subunit N^α-(L-alanyl-D-isoglutaminy)-L-lysyl-D-alanin in cell wall peptidoglycans of Staphylococcus aureus, strain Copenhagen, Micrococcus roseus R 27, and Streptococcus pyogenes group A, type 14. Biochem. J. 5, 3748-3763.
- (85) Muñoz, E., Ghuysen, J.M., Leyh-Bouille, M., Petit, J.F. und Tinnelli, R. (1966): Structural variations in bacterial cell wall peptidoglycans studied with Streptomyces F₁ endo-N-acetylmuramidase. Biochem. J. 5, 3091-3098.
- (86) Najjar, V.A. und Merrifield, R.B. (1966): Solid phase peptide synthesis. VI. The use of o-nitrophenylsulphenyl group in the synthesis of the octadecapeptide bradykininylbradykinin. Biochem. J. 5, 3765-3769.
- (87) Nakel, M. (1972): Biochemische Studien über Mureine ohne Interpeptidbrücken. Dissertation, TU München.
- (88) Nicolson, (1973): persönliche Mitteilung. Garth Nicolson, University of California, San Diego, Dept. Biology.
- (89) Nowotny, A. (1969): Basic exercises in immunochemistry - a laboratory manual. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- (90) Oeding, P. und Grov, A. (1972): Cellular Antigens. The Staphylococci. Ed. J.O. Cohen. J. Wiley&Sons, Inc.
- (91) Organikum; verfaßt von einem Autorenkollektiv, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1964.
- (92) Osborn, M.J. (1969): Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. Ann. Rev. Biochem. 38, 501-538.
- (93) Oxoid (1972): "Oxoid" Handbuch, Oxoid Limited, London.
- (94) Peninsula (1973): Firmenschrift der Firma Toho/Peninsula zur Anwendung der HF-Hochvacuumapparatur, Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, California.
- (95) Perkins, H.R. (1963): A polymer containing glucose and aminohexuronic acid isolated from the cell walls of Micrococcus lysodeikticus. Biochem. J. 86, 475.
- (96) Perkins, H.R. (1965): The action of hot formamide on bacterial cell walls. Biochem. J. 95, 876.
- (97) Pharmacia (1968): Sephadex - gel filtration in theory and practice. Firmenschrift, Pharmacia, Uppsala, Schweden.
- (98) Pharmacia (1969): Sepharose 2B-4B-6B. Firmenschrift, Pharmacia, Uppsala, Schweden.
- (99) Ranu, R.S. (1975): Studies on the immunochemistry of Staphylococcus aureus cell wall: Antigenicity of pentaglycine bridges. Med. Microbiol. Immunol. 161, 53-61.
- (100) Reindel, F. und Hoppe, W. (1958): Über eine Färbemethode zum An-

färben von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen auf Papierchromatogrammen und Papierelektropherogrammen. Chem. Ber. 87, 1103-1107.

- (101) Rogers, H.J., Ward, J.B. und Elliott, T.S.J. (1975): Biosynthesis of wall polymers by bacterial protoplasts. Forth international symposium on yeast and other protoplasts. Nottingham, Sept. 1975.
- (102) Rolicka, M. und Park, J.D. (1969): Antimucopptide antibodies and their specificity. J. Immunol. 103, 196-203.
- (103) Rüde, E. (1970): Struktur und Synthese von Modellantigenen. Angew. Chemie 82, 202-216.
- (104) Sage, H.J., Deutsch, G.F., Fasman, G.D. und Levine, L. (1964): The serological specificity of the poly-alanine immune system. Immunochemistry, 1, 133-144.
- (105) Schachenmayer, W., Heymer, B. und Haferkamp, O. (1975): Antibodies to peptidoglycan in the sera from population surveys. Z. Immun.-Forsch. 149, 179-186.
- (106) Schäfer, H. (1971): Immunelektronenmikroskopie. Beiträge zur Methodik und Bewertung. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- (107) Schechter, I., Schechter, B. und Sela, M. (1966): Combining sites of antibodies with L-alanine and D-alanine specificity and the effect of serum proteolytic activity on their estimation. Biochim. Biophys. Acta 127, 438-456.
- (108) Schechter, B., Schechter, I. und Sela, M. (1970): Antibody combining sites to a series of peptide determinants of increasing size and defined structure. J. Biol. Chem. 245, 1438-1447.
- (109) Schechter, I., Clerici, E. und Zazepitzki, E. (1971): Distinct antigenic specificities of alanine peptide determinants attached to protein carriers via terminal amine or carbonyl groups. Eur. J. Biochem. 18, 561-572.
- (110) Schleifer, K.H. und Kandler, O. (1967): Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von Str. thermophilus und Str. faecalis. Arch. Mikrobiol. 57, 335-365.
- (111) Schleifer, K.H. und Kandler, O. (1967): Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. II. Die Aminosäuresequenz des Mureins von Streptococcus lactis und cremoris. Arch. Mikrobiol. 57, 365-381.
- (112) Schleifer, K.H., Plapp, R. und Kandler, O. (1968): Die Aminosäuresequenz des Mureins von Microbacterium lacticum. Biochim. Biophys. Acta, 154, 573-582.
- (113) Schleifer, K.H., Ried, M. und Kandler, O. (1968): Die Aminosäuresequenz des Mureins von Staphylococcus epidermidis (Winslow and Winslow) Evans, Stamm 66. Arch. Mikrobiol. 62, 198

-208.

- (114) Schleifer, K.H. (1969): Die Mureintypen in der Gattung Microbacterium. Arch. Mikrobiol. 71, 271-282.
- (115) Schleifer, K.H., Huss, L. und Kandler, O. (1969): Die Beeinflussung der Aminosäuresequenz des serinhaltigen Mureins von Staphylococcus epidermidis, Stamm 24, durch die Nährbodenzusammensetzung. Arch. Mikrobiol. 68, 387-404.
- (116) Schleifer, K.H. und Kandler, O. (1970): Amino acid sequence of the murein of Planococcus and other micrococaceae. J. Bact. 103, 387-392.
- (117) Schleifer, K.H. und Krause, R.M. (1971) The immunochemistry of peptidoglycan. The immunodominant site of the peptide subunit and the contribution of each of the amino acids to the binding properties of the peptides. J. Biol. Chem. 246, 986-993.
- (118) Schleifer, K.H. und Krause, R.M. (1971): The immunochemistry of peptidoglycan. Separation and characterization of antibodies to the glycan and to the peptide subunit. Eur. J. Biochem. 19, 471-478.
- (119) Schleifer, K.H. und Kandler, O. (1972): Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bact. Rev. 36, 407-477.
- (120) Schleifer, K.H. (1973): Chemical composition of staphylococcal cell walls. Contr. Microbiol. Immunol. 1, 13-23.
- (121) Schleifer, K.H. und Kocur, M. (1973): Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. Arch. Mikrobiol. 93, 65-85.
- (122) Schleifer, K.H. und Seidl, P.H. (1974): The immunochemistry of peptidoglycan. Antibodies against a synthetic immunogen cross-reacting with peptidoglycan. Eur. J. Biochem. 43, 509-519.
- (123) Schleifer, K.H. und Kloos, W.E. (1975): Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus and descriptions of three new species: Staphylococcus cohnii, Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus xylosus. Int. J. Syst. Bact. 25, 50-61.
- (124) Schleifer, K.H., Hammes, W.P. und Kandler, O. (1976): Effect of endogenous and exogenous factors on the primary structures of bacterial peptidoglycans. Adv. Microbial Physiol. 13, 245-292.
- (125) Schleifer, K.H. und Kloos, W.E. (1975): A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. J. Clin. Microbiol. 1, 337-338.
- (126) Schnabel, E. (1967): Verbesserte Synthese von tert.-Butyloxy-

carbonyl-Aminosäuren durch pH-Stat-Reaktion. Liebigs Ann. Chem. 702, 188-196.

- (127) Schötz, F. (1976): persönliche Mitteilung. Prof. Dr. F. Schötz, Botanisches Institut, Universität München.
- (128) Schroeder, W.A. (1967): Separation of peptides by chromatography on columns of Dowex 1 with volatile developers. Meth. Enzymol. 11, 361-369.
- (129) Schwab, J.M., und Abdulla, E.M. (1968): Antigenic properties of bacterial cell wall mucopeptides. In R. Caravano (ed): Current Research on Group A Streptococcus; p. 124. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation.
- (130) Schwick, H.G., Störicko, K., und Becker, W. (1971): Qualitative Plasma-Proteinbestimmung durch Immunpräzipitation. Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik, Heft 3. Firmenschrift, Behringwerke, Marburg.
- (131) Schwyzer, R., Sieber, P., und Kappeler, H. (1959): Zur Synthese von N-t-Butyloxycarbonylaminosäuren. Helv. Chim. Acta 42, 2622-2624.
- (132) Seidl, H.P. (1973): Immunchemische Untersuchungen am Murein mit synthetischen Antigenen. Diplomarbeit, Universität München.
- (133) Seidl, H.P. und Schleifer, K.H. (1975): Immunochemical studies with synthetic immunogens chemically related to peptidoglycan. Z. Immun.-Forsch. 149, 157-164.
- (134) Sharon, N., Osawa, T., Flowers, H.M., und Jeanloz, R.W. (1966): Isolation and study of the chemical structure of a disaccharide from Micrococcus lysodeikticus cell walls. J. Biol. Chem. 241, 223-230.
- (135) Sharon, N., und Seifter, S. (1964): A transglycosylation reaction catalyzed by lysozyme. J. Biol. Chem. 239, 2398-2399.
- (136) Sheehan, J.C., und Yang, D.D.H. (1958): The use of N-formyl-amino acids in peptide synthesis. J. Am. Chem. Soc. 80, 1154-1158.
- (137) Shier, W.T. (1971): Preparation of a "Chemical Vaccine" against tumor progression (substituted glucosaminyl poly(L-aspartate)). Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2078-2082.
- (138) Sober, H.A., Gutter, F.J., Wyckoff, M.M., und Peterson, E.A. (1956): Column Chromatography of serum proteins on DEAE-Cellulose. J. Amer. Chem. Soc. 78, 756-764.
- (139) Spangenberg, R., Thamm, P., und Wunsch, E. (1971): Zur Behandlung säure-empfindlicher Aminosäure- und Peptidderivate. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 655-656.
- (140) Speck, J.C. und Rynbrandt, D.J. (1967): A convenient method for isolating the disaccharide and the tetrasaccharide in muramidase digests of Micrococcus lysodeikticus cell walls.

Anal. Biochem. 19, 426-433.

- (141) Stavitsky, A.B., und Arquilla, E. (1955): Micromethods for the study of proteins and antibodies. III. Procedure and applications of hemagglutination and hemagglutination inhibition reactions with Bis-diazotized benzidine and protein-conjugated red blood cells. J. Immunol. 74, 306-312.
- (142) Stewart, J.M., und Young, J.D. (1969): Solid phase peptide synthesis. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- (143) Suginaka, H., Kashiba, S., Amano, T., Kotani, S., und Imanishi, T. (1967): Purification and properties of a staphylolytic factor produced by a strain of Staphylococcus epidermidis. Biken J. 10, 109-120.
- (144) Suginaka, H., Kotani, S., Kato, K., Kashiba, S. und Amano, T. (1968): Action of a staphylolytic enzyme (ALE) of a strain of Staphylococcus epidermidis. Biken J. 11, 13-24.
- (145) Swanson, J., Hsu, K.C., und Gotschlich, E.C. (1969): Electron microscopic studies on streptococci. I. M Antigen. J. Exp. Med. 130, 245-258.
- (146) Swanson, J., und Gotschlich, E.C. (1973): Electron microscopic studies on streptococci. II. Group A carbohydrate. J. Exp. Med. 138, 245- 258.
- (147) Takebe, I. (1965): Extent of cross-linkage in the murein sacculus of Escherichia coli B cell wall. Biochim. Biophys. Acta 101, 124-126.
- (148) Tipper, D.J., Ghuyssen, J.M., und Strominger, J.L. (1965): Structure of the cell wall of S. aureus strain Copenhagen. III. Further studies on the disaccharides. Biochem. 4, 468-473.
- (149) Tipper, D.J., und Strominger, J.L. (1966): Isolation of 4-O-8-N-acetyl-muramyl-N-acetylglucosamine and N,6-O-diacetyl-muramyl-N-acetylglucosamine and the structure of the cell wall polysaccharide of Staphylococcus aureus. Biochem. Biophys. Res. Comm. 22, 48-56.
- (150) Tipper, D.J., Strominger, J.L., und Ensign, J.C. (1967): Structure of the cell wall of Staphylococcus aureus, strain Copenhagen. VII. Mode of action of the bacteriolytic peptidase from Myxobacter and the isolation of intact cell wall polysaccharides. Biochem. 6, 906-920.
- (151) Tipper, D.J. (1968): Non-random location of L-serine in the interpeptide bridges of Staphylococcus epidermidis cell wall peptidoglycan. Fed. Proc. 27, 429.
- (152) Tipper, D.J. (1969): Mechanism of autolysis of isolated cell walls of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol., 97, 837-847.
- (153) Tipper, D.J., und Berman, M.F. (1969): Structures of the cell wall peptidoglycans of Staphylococcus epidermidis Texas 26 and Staphylococcus aureus Copenhagen. I. Chain length and average sequence of cross-bridge peptides. Biochem. 8, 2183-2192.

- (154) Tipper, D.J. (1969): Structures of cell wall peptidoglycans of Staphylococcus epidermidis Texas 26 and Staphylococcus aureus Copenhagen. II. Structure of neutral and basic peptides from hydrolysis with the Myxobacter AL-1 peptidase. Biochem. J. 8, 2192-2202.
- (155) Trevelyan, W.E., Procter, D.D., und Harrison, J.S. (1950): Detection of sugars on paper chromatograms. Nature 166, 444.
- (156) Trippen, B. (1973): Die Wirkung von D-Aminosäuren auf die Biosynthese des Mureins. Dissertation, Universität München.
- (157) Vilkas, E., Massot, J.C., und Zissmann, E. (1970): Étude des paires d'une souche de Micromonospora. I. Isolement d'une phosphate de glucosamine. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 7, 77-79.
- (158) Wadström, T., und Hisatsune, K. (1970): Bacteriolytic enzymes from Staphylococcus aureus. Specificity of action of endo- β -N-acetylglucosaminidase. Biochem. J., 120, 735-744.
- (159) Wadström, T., und Vesterberg, O. (1971): Studies on endo- β -acetylglucosaminidase, staphylolytic peptidase and N-acetyl-L-alanine amidase in lysostaphin from Staphylococcus aureus. Acta path. microbiol. scand., Sec. B 79, 248-264.
- (160) Wadström, T. (1973): Bacteriolytic enzymes from staphylococci. Contributions to Microbiol. and Immunol., 1, 397-405.
- (161) Wagner, B., und Wagner, M. (1972): Immunelektronenmikroskopischer Nachweis von Zellwandantigenen bei Streptokokken. I. Vergleichende Darstellung des M-Proteins von Streptococcus pyogenes mit ferritin-, peroxydase- und ferrocenmarkierten Antikörpern. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 222, 468-483.
- (162) Wagner, M. (1967): Reinigung ferritin-markierter Antikörper durch Gelfiltration an Agarose. Naturwissenschaften 54, 444.
- (163) Warth, A.D., und Strominger, J.L. (1971): Structure of peptidoglycan from vegetative cells of Bacillus subtilis. Biochem. J. 10, 4349-4358.
- (164) Weidel, W., und Pelzer, H. (1964): Bagshaped macromolecules - a new outlook on bacterial cell wall. Advan. Enzymol. 26, 193-232.
- (165) Werner, G.H., Maral, R., Floch, H.F., Migloire-Samour, D. und Jollès, P. (1974): Activités biologiques des adjuvants hydrosolubles de faible poids moléculaire extraits de Mycobacterium tuberculosis var. hominis. C.R. Acad. Sc. Paris, Série D 278, 789.
- (166) Weygand, C., und Hilgetag, G. (1970): Organisch Chemische Experimentierkunst. Johannes Ambrosius Barth, Leipzig.
- (167) Wikler, M. (1975a): Isolation and characterization of homogenous rabbit antibodies to Micrococcus lysodeikticus with specificity to the peptidoglycan and to the glucose-N-acetylaminoannuronic polymer. Z. Immun.-Forsch. 149, 193-200.
- (168) Wikler, M. (1975b): Simultaneous occurrence of homogenous antibodies with specificity for polysaccharide and peptidoglycan

in rabbits hyperimmunized with Micrococcus lysodeikticus. Eur. J. Biochem. 53, 19-24.

- (169) Williams, C.A., und Chase, M.W. (1971): Methods in Immunology and immunochemistry, Vol. I-III. Academic Press, New York and London.
- (170) Young, F.E. (1965): Variation in the chemical composition of the cell wall of Bacillus subtilis during growth in different media. Nature 207, 104-105.
- (171) Zeiger, A.R. und Maurer, P.H. (1973): Immunochemistry of a synthetic peptidoglycan-precursor pentapeptide. Biochem. 12, 3387-3394.
- (172) Zehavi, U., und Jeanloz, R.W. (1975): Oligosaccharides derived from chitin. Biochem. Prep. 15, 14-18.
- (173) Zervas, Borovas, D. und Gazis, E. (1963): New methods in peptide synthesis. I. Tritylsulphenyl and o-Nitrophenylsulphenyl-groups as N-protecting groups. J. Amer. Chem. Soc. 85, 3660-3666.

Vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. K.H. Schleifer von 1973-1976 angefertigt.

Herrn Prof. Schleifer danke ich für das große Interesse an meiner Arbeit und für alle persönlichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Frau L. Hagner danke ich für ihre sorgfältige Assistenz.

Herrn Prof. Dr. J. Rudinger bin ich für seine intensive Betreuung während eines Aufenthalts am Institut für Molekularbiologie und Biophysik, ETH, Zürich, zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Metz, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen, Südbayern, Fachbereich Medizin, möchte ich an dieser Stelle für seine großzügige Hilfe bei der Haltung der Versuchstiere meinen besonderen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt allen kollegialen Mitarbeitern des Botanischen Instituts.

Herrn Dr. E. Eder, MPI für Biochemie, Martinsried, danke ich für die Überlassung von Antiseren gegen Kaninchen IgG von der Ziege und Herrn Prof. Dr. B. Heymer, Abteilung Pathologie I, Universität Ulm, Herrn Prof. Schleifer und Dr. M. Wikler, Laboratoire de Physiologie animale, Universität Brüssel, danke ich für Peptidoglycan-Antiseren.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Sachbeihilfen sowie die Finanzierung meiner Stelle als wissenschaftlicher Angestellter und der European Molecular Biology Organization für die finanzielle Unterstützung eines zweimonatigen Aufenthalts am Institut für Molekularbiologie und Biophysik der ETH, Zürich.

Lebenslauf =====

Hans Peter Seidl, geboren am 22. Mai 1948 in München

Vater: Hans Seidl

Mutter: Franziska Seidl, geb. Lämmle

September Juli	1954- 1958	Besuch der Volksschule an der Wörthstraße, München
September Juni	1958- 1967	Besuch des Asam-Gymnasiums, München
Juni	1967	Ablegung der Reifeprüfung
Oktober März	1967 1969	Ableistung des Grundwehrdienstes
April	1969	Aufnahme des Studiums der Biologie/Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
August	1973	Abschluß des Studiums mit dem Grad "Dipl. Biol."
Oktober	1973	Beginn der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität München
Oktober März	1973- 1974	wissenschaftliche Hilfskraft, Universität München
April März	1974- 1976	wissenschaftlicher Angestellter (DFG)
Oktober Dezember	1974- 1974	Gastaufenthalt am Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössisch Technische Hochschule, Zürich, als EMBO-Stipendiat
seit April	1976	wissenschaftlicher Angestellter, Lehrstuhl Mikrobiologie, Technische Universität München

